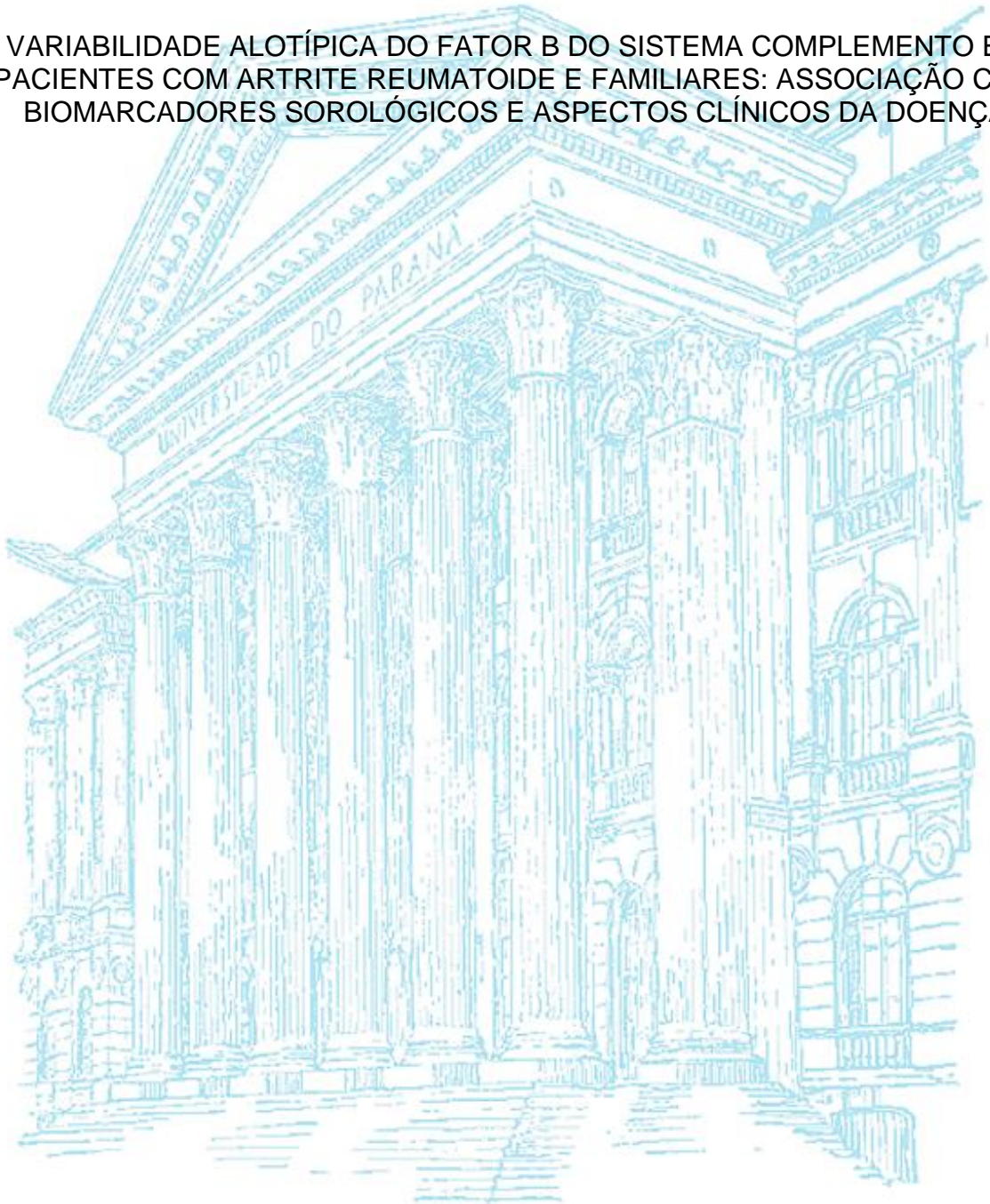


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
FLÁVIA RAPHAELA NASS ARROTÉIA

VARIABILIDADE ALOTÍPICA DO FATOR B DO SISTEMA COMPLEMENTO EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES: ASSOCIAÇÃO COM  
BIOMARCADORES SOROLÓGICOS E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA



CURITIBA  
2014

FLÁVIA RAPHAELA NASS ARROTÉIA

VARIABILIDADE ALOTÍPICA DO FATOR B DO SISTEMA COMPLEMENTO EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES: ASSOCIAÇÃO COM  
BIOMARCADORES SOROLÓGICOS E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Setor de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shirley Ramos da  
Rosa Utiyama

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara Taborda de  
Messias-Reason

CURITIBA  
2014

Arrotéia, Flávia Raphaela Nass

Variabilidade alotípica do fator B do sistema complemento em pacientes com artrite reumatóide e familiares: associação com biomarcadores sorológicos e aspectos clínicos da doença / Flávia Raphaela Nass Arrotéia - Curitiba, 2014.  
185 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Coorientadora: Professora Dra. Iara Taborda de Messias-Reason

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Artrite reumatoide. 2. Via alternativa do complemento. 3. Fator B.  
4. Autoanticorpos. 5. Doenças autoimunes. I. Utiyama, Shirley Ramos da Rosa.  
II. Messias-Reason, Iara Taborda. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

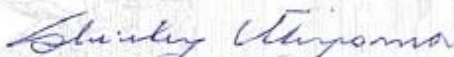
CDD 616.7227

## TERMO DE APROVAÇÃO

**FLÁVIA RAPHAELA NASS ARROTEIA**

**Título: "VARIABILIDADE ALOTÍPICA DO FATOR B DO SISTEMA COMPLEMENTO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE E FAMILIARES: ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES SOROLÓGICOS E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA"**

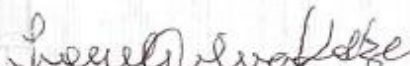
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



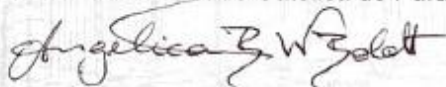
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Shirley Ramos da Rosa Utiyama  
Orientadora



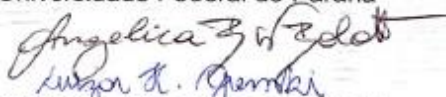
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Barreto Gameiro Silva  
Faculdade Evangélica do Paraná



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lorete Maria da Silva Kotze  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angelica Beate Winter Boldt  
Universidade Federal do Paraná



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luiza Helena Gremski  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de setembro de 2014.

Aos meu filho Arthur, por todas as  
horas abdicadas para a realiza  o  
deste trabalho

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os pacientes com AR que acreditaram em nossos estudos e sem os quais este trabalho seria inviável.

À Professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama, mais que minha orientadora, minha amiga e meu exemplo de profissional e pessoa, dedicada, paciente, companheira e íntegra em tudo que se propõem a fazer. Obrigada pelos tantos anos de convivência, paciência, aprendizagem e amor pela Imunologia.

À Professora Dra. Iara Tarboda de Messias-Reason, pela co-orientação, ensinamentos, carinho e incentivo com sábias palavras.

À Dra. Thelma Laroca Skare, por todo auxílio desde o início deste trabalho, desde a coleta das amostras até o fim da escrita da tese. Obrigada por todas as correções e contribuições valiosas que realizou com tanta eficiência e competência.

Ao Professor Dr. Renato Nisihara, pela amizade de tantos anos, pelo auxílio em diferentes etapas na realização deste trabalho e pelas constantes discussões sobre imunologia desde a iniciação científica, as quais contribuíram para meu aprendizado.

À Dra. Isabela Goeldner, pelo fornecimento das amostras de pacientes e familiares, sem as quais a realização desta pesquisa não seria possível; pela ajuda constante com toda parte estatística e pela amizade e carinho cultivados no decorrer de todos esses anos de convivência no laboratório.

Ao Valmir Mocelin por toda dedicação e prontidão para auxiliar na parte experimental dessa pesquisa e pela amizade de tantos anos.

À Vanessa Picceli pelo auxílio na parte experimental e pela amizade sincera.

À Dra. Angélica Beate Winter Boldt por toda revisão da parte estatística, pelo incentivo de sempre e pelo carinho com que me trata.

À Dra. Marcia Holsbach Beltrame pela orientação final em relação os resultados estatísticos e finalização da tese.

À Banca de qualificação, Dra. Lilian e Dra. Patrícia, pela valiosa contribuição nas correções realizadas e sugestões para enriquecimento deste trabalho.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da UFPR, que de alguma forma estiveram presentes e me auxiliaram durante a pesquisa.

A coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu marido, Eduardo, pela paciência e compreensão durante todos esses anos dedicados à pesquisa.

Com muito carinho agradeço o apoio dos meus maiores incentivadores para conclusão deste trabalho, meus pais, Mauro e Lúcia, que sempre, em todos os momentos estiveram dispostos e prontos para me ajudar.

Ao meu filho Arthur, por todo amor.

Agradeço a Deus, acima de tudo, por me amar e me dar forças todos os dias para concretizar esse sonho.

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica, com distribuição familiar, fortemente associada ao aparecimento precoce de autoanticorpos, cuja concomitância se relaciona a um pior prognóstico da doença. A via alternativa (VA) do sistema complemento tem importante participação no processo inflamatório da AR e o fator B (BF) constitui a proteína central de ativação dessa via. Neste estudo, investigou-se a variabilidade alotípica de BF em pacientes com AR e familiares, visando associá-la com biomarcadores sorológicos e aspectos clínicos da doença. Foram estudados 210 pacientes com AR (178 ♀; 32 ♂; 18-84 anos) e 198 familiares (121 ♀; 77 ♂; 7-91 anos). O grupo controle incluiu 98 indivíduos sadios (81 ♀; 17 ♂; 23-81 anos) da mesma área geográfica. Os alótipos de BF foram determinados por eletroforese em gel de agarose, sob alta voltagem e refrigeração constante, seguida de imunofixação com anticorpo anti-BF humano. Investigou-se a presença dos autoanticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP), anti-vimentina mutada citrulinada (anti-MCV) e fator reumatoide IgA (FR-IgA) por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o FR-IgM por aglutinação em látex. A positividade total dos anticorpos foi maior nos pacientes comparado a familiares e controles ( $p < 0,0001$ ). O anti-CCP foi o biomarcador mais comum nos pacientes (75,7%) e o FR-IgA nos familiares (14,6%), diferindo significativamente dos indivíduos sadios (5,4%;  $p = 0,030$ ; OR=2,98). A positividade concomitante para os quatro biomarcadores predominou entre os pacientes (46,2%;  $p < 0,0001$ ), enquanto nos familiares e controles predominou apenas um autoanticorpo ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,016$ , respectivamente). Não ocorreu associação entre o número de biomarcadores positivos e idade de diagnóstico, classe funcional e tabagismo nos pacientes. A Síndrome de Sjögren secundária (SS) foi mais frequente entre pacientes com três biomarcadores positivos simultaneamente ( $p = 0,018$ ; OR=2,73), enquanto pacientes soronegativos apresentaram diminuição de manifestações extra-articulares (MEA;  $p = 0,017$ ; OR=0,28). Nos familiares, a ocorrência de artralgia esteve significativamente associada à positividade dos biomarcadores. A ausência de associação na distribuição dos fenótipos e alótipos de BF entre pacientes/controles e familiares/controles mostrou que não houve relação entre as variantes alotípicas de BF e o desenvolvimento da doença nos indivíduos em estudo, assim como não houve relação entre tais variantes e o gênero dos pacientes, idade de início e classe funcional da AR. O fenótipo BF FS07 e alótipo BF\*S07 associaram-se significativamente às MEA nos pacientes ( $p = 0,0487$ ;  $p = 0,021$ ; OR=6,62, respectivamente). Uma diminuição significativa na positividade do anti-MCV nos pacientes com fenótipo BF F ( $p = 0,021$ ; OR=0,22), e aumento naqueles com alótipo BF\*S ( $p = 0,017$ ; OR=3,77), caracterizou uma possível relação dessas variantes com a presença do anti-MCV. A maior frequência de FR-IgA nos familiares com BF FS07 ( $p = 0,018$ ; OR=7,78), e a associação deste fenótipo e do alótipo BF\*S07 com as MEA nos pacientes ( $p = 0,021$ ; OR=6,62), sugerem esta variante de BF como um marcador de mau prognóstico na doença e, aliado aos demais resultados, reforçam a importante participação da VA na fisiopatogenia da AR.

**Palavras chave:** artrite reumatoide, via alternativa do complemento, fator B, autoanticorpos, doenças autoimunes.



## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease with familial distribution and strong correlation with early development of autoantibodies, whose coexistence is associated with a worse prognosis. The alternative pathway of the complement system plays an important role in the inflammatory process of RA. Factor B (BF) is a protein that exerts a central role in the activation of this pathway. This study investigated the allotypic variability of BF in RA patients and relatives, aiming to associate it with serological biomarkers and clinical aspects of the disease. Serum samples of 210 patients with RA (178 ♀; 32 ♂; 18-84 years) and 198 relatives (121 ♀, 77 ♂, 7-91 years) were evaluated. The control group included 98 healthy individuals (81 ♀, 17 ♂, 23-81 years) from the same geographic area. The BF allotypes were determined by high-voltage agarose gel electrophoresis, under constant cooling, followed by immunofixation with anti-human BF antibody. Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP), anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) and IgA-rheumatoid factor (RF) were determined by ELISA and IgM-RF by latex agglutination. Total positivity of antibodies was higher in patients compared to relatives and controls ( $p < 0.0001$ ). Anti-CCP was the most common biomarker in patients (75.7%) and RF-IgA the most common in relatives (14.6%) differing significantly from controls (5.4%,  $p = 0.030$ ,  $OR = 2.98$ ). Concomitant positivity for the four biomarkers was more common in patients (46.2%,  $p < 0.0001$ ), while most relatives and controls were positive for just one of them ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.016$ , respectively). No association was observed between the number of positive biomarkers and age of disease onset, functional class and tobacco exposure in patients. Secondary Sjögren syndrome was more frequent in patients with 3 simultaneous positive biomarkers ( $p = 0.018$ ,  $OR = 2.73$ ), while seronegative patients presented less extra articular manifestations (EAM,  $p = 0.017$ ,  $OR = 0.28$ ). In relatives, the occurrence of arthralgia was significantly associated with positive biomarkers. There was no difference in the distribution of BF phenotypes and allotypes between patients and controls and relatives and controls, as well as in relation to gender, age of onset and functional class of RA. The increase of BF S ( $p = 0.0391$ ) in patients compared to relatives turned not significant after logistic regression correction. The BF FS07 phenotype and allotype BF\*S07 were significantly associated with EAM in patients ( $p = 0.0487$ ,  $p = 0.021$ ,  $OR = 6.62$ , respectively). A significant decrease in positivity of anti-MCV in patients BF F ( $p = 0.021$ ,  $OR = 0.22$ ), and increased in those with allotype BF\*S ( $p = 0.017$ ,  $OR = 3.77$ ), characterized a possible relationship of these variants with anti-MCV. The highest frequency of RF-IgA in relatives BF FS07 ( $p = 0.018$ ,  $OR = 7.78$ ), and the association of this phenotype and allotype BF\*S07 in patients with EAM ( $p = 0.021$ ;  $OR = 6.62$ ), suggests that this BF variant is a marker of poor prognosis in disease and, in addition with the other results, stresses the important role of the alternative pathway in RA pathogenesis.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, alternative pathway of complement, factor B autoantibodies, autoimmune diseases.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 DEFORMIDADE NAS ARTICULAÇÕES: A) AR INICIAL; B) e C) AR EM ESTÁGIOS AVANÇADOS.....	22
FIGURA 2 - MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES: A) Nódulo Reumatoide; B) Vasculite e C) Comprometimento Ocular .....	24
FIGURA 3 - REAÇÃO DE CITRULINIZAÇÃO.....	36
FIGURA 4 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC) .....	44
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC) ....	44
FIGURA 6 – PRÓ ENZIMA NATIVA FATOR B .....	46
FIGURA 7 - ATIVAÇÃO DA VIA ALTERNATIVA DO SC .....	47
FIGURA 8 - PAPÉIS FUNCIONAIS DA PROPERDINA .....	47
FIGURA 9 - VARIANTES POLIMÓRFICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ALTA VOLTAGEM.....	51
FIGURA 10 - PLACA DE VIDRO PRÉ AQUECIDA E CUBA DE ELETROFORESE COM TAMPÃO .....	62
FIGURA 11 - VARIANTES ALOTÍPICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM.....	63
FIGURA 12– LEITOR DE ELISA.....	64
FIGURA 13 – AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA A DETERMINAÇÃO DO FR.....	68
FIGURA 14 – HIPÓTESE DO MECANISMO IMUNOLÓGICO PARA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR COMPLEXOS IMUNES EM INDIVÍDUOS COM A VARIANTE ALOTÍPICA BF *S07 .....	119

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA AR (ACR E EULAR, 2010).	32
TABELA 2 RESULTADO DAS AMOSTRAS DE SOROS PARA O ANTI-CCP DE ACORDO COM AS UNIDADES OBTIDAS .....	67
TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR.....	71
TABELA 4 – CORRELAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES NOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE .....	76
TABELA 5 – ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE .....	76
TABELA 6 - DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR E SUAS ASSOCIAÇÕES COM OS BIOMARCADORES.....	80
TABELA 7 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO .....	82
TABELA 8 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DURAÇÃO DA DOENÇA.....	82
TABELA 9 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA .....	83
TABELA 10 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CLASSE FUNCIONAL .....	83
TABELA 11 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AO TABAGISMO .....	84
TABELA 12 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES (MEA).....	85
TABELA 13 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES MEA .....	85
TABELA 14 – ASSOCIAÇÃO ENTRE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E SOROLÓGICOS COM A POSITIVIDADE DE BIOMARCADORES EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE .....	87
TABELA 15 – FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES. ....	88

TABELA 16 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES .....	89
TABELA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALOTÍPICAS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES. ....	90
TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO, EM RELAÇÃO AO GÊNERO DOS INDIVÍDUOS (F vs M) .....	91
TABELA 19 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR, EM RELAÇÃO À IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA.....	92
TABELA 20 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CLASSE FUNCIONAL DA DOENÇA.....	92
TABELA 21 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE MEA.....	93
TABELA 22 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES .....	95
TABELA 23 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS FAMILIARES DE PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À ARTRALGIA.....	96
TABELA 24 – ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES EM RELAÇÃO À POSITIVIDADE DOS BIOMARCADORES .....	97
TABELA 25 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE EM RELAÇÃO À CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES.....	98
TABELA 26 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM AR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTI-CCP E ANTI-MCV .....	99
TABELA 27 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA.....	100

TABELA 28 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTI-CCP E ANTI-MCV .....	101
TABELA 29 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA .....	101

### **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 – SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES E A AR.....	102
QUADRO 2 – SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS FENÓTIPOS E PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF E A AR .....	103

### **LISTA DE GRÁFICOS**

GRÁFICO 1 – POSITIVIDADE TOTAL DOS AUTOANTICORPOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	72
GRÁFICO 2 – POSITIVIDADE INDIVIDUAL DOS BIOMARCADORES NOS GRUPOS EM ESTUDO .....	73
GRÁFICO 3 – POSITIVIDADE DOS BIOMARCADORES DENTRE OS GRUPOS EM ESTUDO .....	74
GRÁFICO 4 – TÍTULOS DE ANTI-CCP, ANTI-MVC, FR-IgM E FR-IgA EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES .....	75
GRÁFICO 5 – NÚMERO DE BIOMARCADORES POSITIVOS SIMULTANEAMENTE NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	78
GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACR** – Colégio Americano de Reumatologia  
**ACPA** – Anticorpos contra peptídeos citrulinados  
**AIJ** – Artrite idiopática juvenil  
**Anti-CCP** – Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado  
**Anti-MCV** – Anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada  
**APC** – Célula apresentadora de antígeno  
**BCR** – Receptores de linfócitos B  
**BF** - Fator B  
**CII** – Colágeno tipo II  
**COMP** – Proteína da cartilagem oligomérica da matriz  
**DAI** - Doença autoimune  
**DAS** – Índice de atividade da doença  
**ELISA** - Enzima imunoensaio  
**EULAR** – Liga Européia contra o Reumatismo  
**FAN** - Fator antinuclear  
**HLA** - Antígeno leucocitário humano  
**IC** - Imunocomplexos  
**IL** – Interleucina  
**INF** - interferon  
**FAN** – Fator anti-nuclear  
**FcRs** – Fração constante de imunoglobulinas  
**FLSs** – Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos  
**FR** – Fator reumatoide  
**FR-IgA** – Fator reumatoide da classe IgA  
**FR-IgG** – Fator reumatoide da classe IgG  
**FR-IgM** – Fator reumatoide da classe IgM  
**LES** – Lúpus Eritematoso Sistêmico  
**MAC** - complexo de ataque a membrana  
**MBL** - Lectina ligante de manose  
**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade  
**MMP** – Metaloproteinases da matriz

**NK** – Células natural killer

**PAMPs** – Padrões moleculares associados a patógenos

**PBS** - Tampão fosfato salina

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

**RFPL** – Polimorfismo de fragmentos de restrição

**SC** - Sistema complemento

**SE** – Shared epitope ou epítipo compartilhado

**SS** – Síndrome de Sjögren secundária

**TLR** - Receptor *toll like*

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**tTG** - anticorpo anti-transglutaminase tecidual

**VA** - Via alternativa

**VHS** - Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
3.1 ARTRITE REUMATOIDE .....	21
3.1.1 Considerações Gerais .....	21
3.1.2 Fatores de Patogenicidade da AR.....	25
3.1.3 Fisiopatogenia da Artrite Reumatoide .....	27
3.1.4 Diagnóstico da Artrite Reumatoide .....	30
3.1.5 Fator Reumatoide.....	33
3.1.6 Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado .....	35
3.1.7 Anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV).....	39
3.1.8 Familiares de Pacientes com Artrite Reumatoide.....	40
3.2 SISTEMA COMPLEMENTO .....	42
3.2.1 Via Alternativa e o Fator B.....	45
3.2.1.1 Polimorfismo de BF e implicações clínicas.....	49
3.2.2 Sistema Complemento e Artrite Reumatoide .....	52
3.2.2.1 Via alternativa e artrite reumatoide.....	54
3.2.2.2 Polimorfismo de BF na artrite reumatoide .....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA.....	58
4.2 CASUÍSTICA .....	58
4.2.1 Pacientes com Artrite Reumatoide .....	58
4.2.2 Familiares de Pacientes com Artrite Reumatoide .....	59
4.2.3 Grupo Controle .....	60
4.3 MÉTODOS.....	60
4.3.1 Obtenção das Amostras.....	60
4.3.2 Tipagem do Fator B .....	61



4.3.3 Determinação do Fator Reumatoide IgA (FR-IgA).....	63
4.3.3.1 Validação do ensaio .....	64
4.3.3.2 Cálculo e interpretação dos resultados .....	65
4.3.4 Determinação do Anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV) .....	65
4.3.4.1 Validação do ensaio .....	66
4.3.4.2 Cálculo e interpretação dos resultados .....	66
4.3.5 Determinação do Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) .....	67
4.3.6 Determinação do Fator Reumatoide IgM (FR-IgM) .....	68
4.3.7 Correlação Clínico-laboratorial.....	69
4.3.8 Análise Estatística .....	69
5 RESULTADOS.....	71
5.1 ANTICORPOS ANTI-CCP, ANTI-MCV, FR-IgM E FR-IgA EM PACIENTES COM AR, FAMILIARES E CONTROLES.....	72
5.1.1 Positividade dos biomarcadores em pacientes com AR, familiares e controles em relação aos títulos de anticorpos .....	74
5.1.2 Análise da concomitância dos biomarcadores nos grupos em estudo.....	77
5.1.3 Concomitância dos biomarcadores em pacientes com AR e familiares.....	77
5.1.4 Análise dos biomarcadores em relação aos dados demográficos e clínicos dos pacientes com AR.....	78
5.1.5 Análise dos biomarcadores em relação aos dados demográficos, clínicos e sorológicos dos familiares de pacientes com AR.....	86
5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES.....	88
5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO GÊNERO.....	90
5.4 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AOS DADOS CLÍNICOS .....	91
5.5 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS FAMILIARES DE PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE ARTRALGIA.....	96
5.6 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AOS BIOMARCADORES PARA AR.....	96
6 – DISCUSSÃO .....	104
6.1 - BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR E FAMILIARES.....	104

6.2 - VARIABILIDADE ALOTÍPICA DE BF E BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR E FAMILIARES .....	112
7 - CONCLUSÕES .....	123
REFERÊNCIAS .....	125
APÊNDICES .....	152
ANEXOS .....	183

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) acomete aproximadamente 1% da população mundial. Embora sua patogênese ainda não se encontre completamente elucidada, a doença continua sendo alvo de inúmeras pesquisas voltadas não apenas à maior compreensão da sua etiologia e fatores ligados à sua expressão clínica, mas, também, à busca de recursos terapêuticos que proporcionem melhora na qualidade de vida desses pacientes. Estes, quando não tratados precoce e adequadamente, poderão apresentar lesões graves nas articulações, restrição nas atividades do dia a dia (TAYLOR *et al.*, 2011) e doenças de caráter isquêmico, responsáveis por alta mortalidade entre esses indivíduos (SOLOMON *et al.*, 2013).

A AR é o protótipo de doença complexa e multifatorial, resultante da interação entre componentes genéticos e ambientais. A participação de mecanismos imunológicos contribui amplamente na destruição tecidual característica da doença, estando frequentemente relacionada aos eventos mediados por linfócitos T, B, neutrófilos e células dendríticas, entre outras (BARTOK, FIRESTEIN, 2010). Além disso, estudos envolvendo gêmeos e familiares de pacientes propõem que a ocorrência da AR está associada a uma forte agregação familiar (SILMAN *et al.*, 1993; MAC GREGOR *et al.*, 2000).

Kolfenbach e colaboradores (2009) sugerem um modelo em três fases para o desenvolvimento da doença: risco genético inicial, a autoimunidade pré-clínica e, por fim, a doença clínica. Interações entre fatores ambientais e riscos genéticos levam à autoimunidade pré-clínica e assintomática, caracterizada pela detecção precoce de autoanticorpos como o fator reumatoide (FR) e o anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP), além de elevados níveis de marcadores pró-inflamatórios.

Apesar de a relação entre positividade para o FR e desenvolvimento da AR não estar totalmente esclarecida, ambos estão intimamente relacionados. Estudos reportam associação entre o fator reumatoide da classe IgA (FR-IgA) e pior prognóstico da artrite erosiva, assim como revelam que na AR recente, o FR-IgA pode ser um marcador preditivo mais específico para gravidade da doença em relação ao fator reumatoide da classe IgM (FR-IgM) ou fator reumatoide da classe IgG (FR-IgG) (TURESSON, MATTESON, 2009; NELL-DUXNEUNER *et al.*, 2010).

Desde a descoberta do FR, pesquisadores buscam outros marcadores para AR. Nos últimos anos o estudo de anticorpos contra peptídeos citrulinados (ACPA) tem demonstrado que, na maioria das vezes, eles são biomarcadores mais úteis no diagnóstico da doença que o FR. Diversos ensaios detectaram a reatividade dos ACPA contra diferentes epítomos em proteínas citrulinadas, gerando o anticorpo anti-CCP e o anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV) (BARTOLONI *et al.*, 2012; BARRA *et al.*, 2013).

O anticorpo anti-CCP tem sido considerado importante ferramenta diagnóstica e prognóstica pela sua alta especificidade, podendo, em geral, ser detectado previamente às manifestações clínicas da doença. Mais recentemente, a vimentina citrulinada foi identificada como potencial autoantígeno, tendo sido desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção dos anticorpos anti-MCV (BANG *et al.*, 2007; WIILK *et al.*, 2010; SIZOVA, 2012). Supõe-se que a imunidade desencadeada pelos autoantígenos citrulinados possa ser artrítogênica, atribuindo-se aos mesmos um papel ativo na gênese da doença.

Alguns estudos têm indicado que a presença do FR e do anti-CCP pode preceder o aparecimento da AR por vários anos (RANTAPAA-DAHLQVIST *et al.*, 2003; NIELEN *et al.*, 2004), sendo relatada a presença destes não somente entre pacientes, mas em familiares não afetados de famílias com múltiplos casos da doença (KOLFENBACH *et al.*, 2009; ARLESTIG *et al.*, 2012).

Na população brasileira não existem relatos considerando a frequência dos anticorpos anti-MCV e demais biomarcadores entre familiares de pacientes com AR. Neste contexto, a detecção dos autoanticorpos relacionados à doença, incluindo FR-IgM, FR-IgA, anti-CCP e anti-MCV pode aumentar a compreensão do desenvolvimento desta afecção nessa população.

A inflamação nas articulações é um processo complexo no qual existe participação ativa do sistema complemento (SC), existindo estudos que demonstram a ativação e interação das três vias na AR: a clássica, a alternativa e das lectinas (NEUMANN *et al.*, 2002). Embora o SC seja considerado um componente sérico, suas proteínas podem ser encontradas em altas concentrações no líquido sinovial. Durante a lesão da cartilagem, proteínas da matriz extra-celular são liberadas pelas proteinases, podendo exercer papel relevante na propagação da inflamação e ativação do SC na AR (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Estudos com gêmeos monozigóticos (MacGREGOR *et al.*, 2000; SVENDSEN *et al.*, 2002) e familiares de pacientes com AR (BALI *et al.*, 1999; ARLESTIG *et al.*, 2012; SEONG-KYU *et al.*, 2013) destacam a contribuição dos fatores genéticos no desenvolvimento da afecção e a relevância da inclusão desses indivíduos nas investigações.

Entre os componentes do SC com polimorfismo genético envolvido na susceptibilidade ou proteção a determinadas doenças, destacam-se C2, C4 e BF, codificados por genes MHC de classe III, do cromossoma 6 humano. O fator B (BF) tem um papel central na ativação da via alternativa (VA). A participação da VA na AR não se encontra totalmente estabelecida, contudo, produtos de ativação por esta via, tais como o Bb, estão aumentados no fluído sinovial (BRODEUR *et al.*, 1991). Modelos animais de AR demonstram de forma surpreendente, que anticorpos artritogênicos são completamente dependentes da VA ao invés da via clássica, como seria esperado (BANDA *et al.*, 2006), sendo a ativação da VA por anticorpos anti-CCP descrita, em estudos recentes, como necessária para indução da doença (TROUW *et al.*, 2009).

Além disso, a interação da proteína da cartilagem oligomérica da matriz (COMP) com a properdina e C3, e a correlação de COMP-C3b com a atividade da doença na AR, e não em outras doenças, sugere um relevante papel da VA na AR. Com isso, a VA se transforma num alvo potencial de pesquisas farmacológicas destinadas ao controle da inflamação e prevenção de danos articulares (SJÖBERG, TROUW, BLOM, 2009; HAPPONEN *et al.*, 2012). Corroborando as observações acima, concentrações de BF no líquido sinovial estão mais reduzidas em AR do que em osteoartrite (NEUMANN *et al.*, 2002; LOW, MOORE, 2005; OKROJ *et al.*, 2007).

Assim sendo, entende-se que o polimorfismo de BF pode vir a ser um marcador importante na ocorrência e na expressão da AR. Todavia até o presente, relatos de polimorfismo do BF em AR são restritos a algumas populações, e de forma geral, direcionados apenas aos pacientes (BRAUTBAR *et al.*, 1986; TAKEUCHI *et al.*, 1989; WATZCO, MESSIAS-REASON, 1994).

A população brasileira é caracterizada pela grande mistura de etnias, o que a torna única em determinados aspectos, não permitindo a transposição de dados obtidos em populações mais homogêneas. No Brasil não existem investigações do polimorfismo de BF em pacientes com AR e familiares concomitantemente, assim

como não se dispõe de dados de associação entre a variabilidade alotípica de BF, aspectos clínicos e sorológicos (FR-IgM, FR-IgA, anti-CCP e anti-MCV). Tais considerações ressaltam a relevância e aplicabilidade do presente estudo que, além de apresentar caráter inédito, contribuirá para maior compreensão da fisiopatologia dessa doença reumática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a variabilidade alotípica do fator B (BF) do sistema complemento em pacientes com Artrite Reumatoide (AR) e familiares, e associá-la com biomarcadores sorológicos e aspectos clínicos da doença.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações séricas do fator reumatoide IgA (FR-IgA), fator reumatoide IgM (FR-IgM), anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) e do anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV) em pacientes com AR e familiares e estabelecer possíveis associações com as variantes alotípicas de BF e com aspectos clínicos da doença;
- Analisar a concomitância dos biomarcadores em pacientes com AR e familiares e sua relação com aspectos clínicos e demográficos dos grupos em estudo;
- Determinar a frequência de distribuição das variantes alotípicas de BF em pacientes com AR, familiares e controles sadios, visando verificar se há associação entre as variantes desse componente e a doença nos indivíduos em estudo;
- Estabelecer possíveis associações entre as variantes alotípicas de BF com aspectos clínicos e demográficos dos pacientes e familiares;



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ARTRITE REUMATOIDE

##### 3.1.1 Considerações Gerais

A artrite reumatoide (AR) caracteriza-se por uma clínica definida, gerada pela inflamação crônica em diversas articulações, associada à destruição de ossos e cartilagens. É uma doença autoimune sistêmica, sendo induzida pela combinação de fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais (KLARESKOG *et al.*, 2006; TEDESCHI *et al.*, 2013).

A AR é considerada como sendo uma doença comum, que afeta aproximadamente 0,24% a 1% da população mundial e cujo impacto sócio-econômico é relevante, considerando-se as potenciais morbidades articulares inerentes à mesma. Manifesta-se com maior frequência no gênero feminino, em uma proporção aproximada de 3 mulheres:1homem, e tem seu pico entre 35 e 55 anos de idade (LAUFER, 2010; GOELDNER *et al.*, 2011a).

O autoantígeno ou fator externo que exerce um papel crítico no desencadeamento deste processo autoimune ainda é desconhecido. Sabe-se, entretanto, que existem falhas nos mecanismos de regulação da resposta imune envolvendo a participação de células da imunidade inata, incluindo-se neutrófilos, macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs), assim como a perda de tolerância por células B e T (PRATT; ISAACS; MATTEY, 2009).

Um importante avanço na AR foi a compreensão de que a autoimunidade direcionada contra proteínas citrulinadas é altamente específica para esta afecção e possivelmente carregada de significado patológico (NISHIMURA *et al.*, 2007). Clinicamente, pacientes positivos para o anticorpo anti-peptídico cíclico citrulinado (anti-CCP), apresentam um curso mais agressivo de doença em relação aos negativos, assim como um perfil de risco genético diferenciado (HUIZINGA *et al.*, 2005).

A presença de diferentes estímulos em indivíduos que apresentam alguma falha no sistema imune propicia a instalação de um processo inflamatório. A

persistência prolongada desses fatores conduzirá à cronificação da doença, com proliferação da membrana sinovial e liberação de enzimas produzidas por células no local. A destruição das estruturas articulares (cartilagens e ossos), bem como dos tendões e ligamentos, surgirão em decorrência dessa inflamação não controlada (PABLOS, CAÑETE, 2013).

Em sua forma clássica, a AR acomete frequentemente articulações sinoviais periféricas, tais como articulações metatarsfalangeanas, tornozelos e punhos, podendo haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris, e em alguns casos, levar a deformidades e limitações do movimento de forma permanente (FIGURA 1). Manifesta-se geralmente de forma simétrica e as articulações afetadas apresentam sinais inflamatórios como edema, calor, rubor, dor e rigidez matinal prolongada (IMBODEN, 2009).

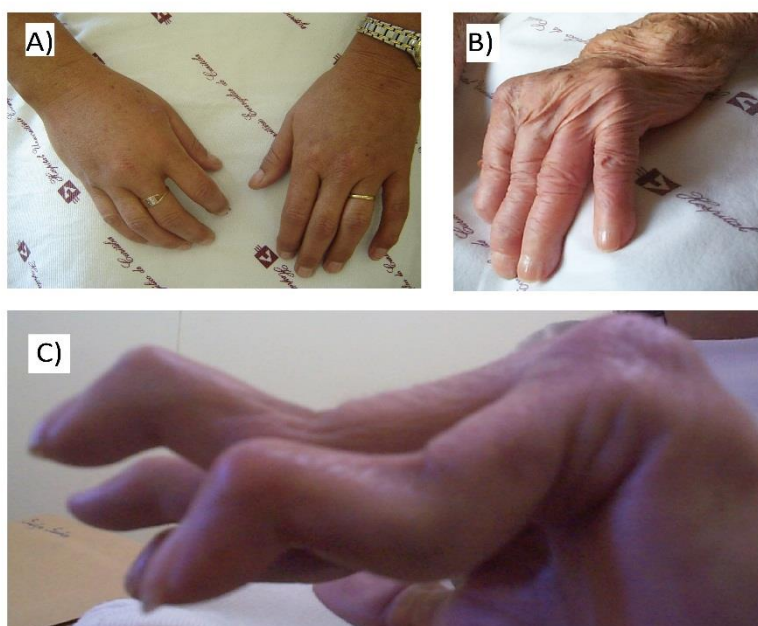


FIGURA 1 DEFORMIDADE NAS ARTICULAÇÕES: A) AR INICIAL; B) e C) AR EM ESTÁGIOS AVANÇADOS

FONTE: Imagem cedida pela Dra. Thelma L. Skare - Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico, Curitiba, PR

A inflamação induz um aumento na produção de líquido sinovial, provocando dificuldade de movimentos e aumento da dor (PABLOS, CAÑETE, 2013). A dor pode

ser muito intensa, o que impede que os pacientes realizem as atividades comuns do dia a dia.

A AR pode ter um curso clínico diferenciado, influenciado pela susceptibilidade individual. No início da doença, a maioria dos pacientes apresenta dor articular e rigidez matinal nas mãos, porém, para outros, os joelhos, pés ou ombros são acometidos no início. Outro aspecto que pode diferir é a intensidade da dor e da inflamação em diferentes articulações. Alguns pacientes apresentam doença leve e intermitente, enquanto outros sofrem uma forma mais intensa e persistente (BRENOL *et al.*, 2007).

Embora o principal sintoma na AR seja a inflamação das articulações, alguns pacientes apresentam manifestações extra-articulares (MEA) e outras doenças autoimunes (DAI) concomitantes (TEHLIRIAN, BATHON, 2008).

As MEA ocorrem igualmente em homens e mulheres e podem aparecer em qualquer idade (MATTESON, 2003). Estima-se que 40% dos pacientes apresentem MEA em algum momento do curso da doença, das quais 15% são consideradas graves (HARRISON; FAUCI, 2008). São exemplos de MEA mais comumente encontradas na literatura: nódulos reumatoides, pericardite, derrame pericárdico, pleurite, derrame pleural, doença pulmonar intersticial, hipertensão da artéria pulmonar, síndrome de Caplan, síndrome de Felty, anemia de doença crônica, trombocitose, neuropatia, esclerite, episclerite, síndrome Sicca, glomerulonefrite, úlceras cutâneas, vasculites, amiloidose, tenossinovite de De Quervain e Síndrome de Sjögren (FIGURA 2) (TURRESSON *et al.*, 2003; TURRESSON *et al.*, 2007; TURIEL *et al.*, 2009).

As doenças de caráter isquêmico são importantes em pacientes com AR, pois representam a causa de aproximadamente 40% das mortes entre esses indivíduos (SOLOMON *et al.*, 2013). A doença extra-articular grave predispõe a ocorrência de um primeiro evento cardiovascular mais cedo, sendo aumentada em quatro vezes a chance de um infarto agudo do miocárdio (TURESSON; JACOBSSON; BERGSTRÖM, 1999).

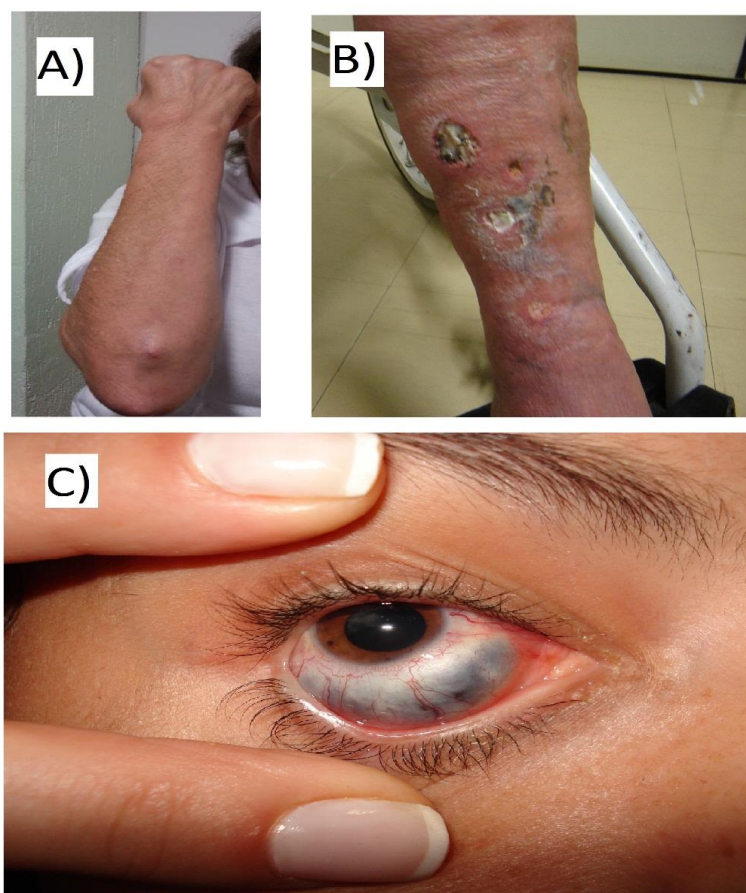


FIGURA 2 - MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES: A) Nódulo Reumatoide; B) Vasculite e C) Comprometimento Ocular

FONTE: Imagem cedida pela Dra. Thelma L. Skare - Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico, Curitiba, PR

Apesar das infecções pulmonares e a toxicidade pulmonar por drogas serem complicações frequentes, a doença pulmonar diretamente associada a AR é mais comum sendo responsável por 10%-20% das mortes diretamente atribuídas à AR (BROW, 2007). Os nódulos reumatoides estão correlacionados com o aparecimento de MEA e também com mau prognóstico da AR em geral (SKARE, 2007)

A síndrome de Sjögren corresponde a uma DAI sistêmica que acomete primeiramente glândulas salivares e lacrimais, levando ao quadro clínico de olho seco, boca seca e hipertrofia de parótidas (BARBIERI; CHIEREGHIN, 2009). São reconhecidas duas formas da doença, a Síndrome de Sjögren primária, que aparece por ela mesma e não está associada a outra DAI, e a Síndrome de Sjögren secundária, a qual ocorre na presença de doença autoimune do tecido conjuntivo

subjacente, tais como AR, lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerodermia, polimiosite e cirrose biliar primária (BERGLOVÁ, *et al.*, 2011)

### 3.1.2 Fatores de Patogenicidade da AR

O desenvolvimento da AR resulta da interação entre fatores genéticos, ambientais, imunológicos e hormonais.

Importantes aspectos genéticos relacionados a AR já foram descritos, principalmente através de associações com polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imune e/ou inflamatória. A prevalência da AR na população mundial é estimada em 0,24% a 1%, no entanto, esta se eleva para 2% a 4% entre irmãos e filhos de pacientes com AR (HARNEY, WORDSWORTH, 2002; FIRESTEIN, 2003).

Estudos envolvendo gêmeos monozigóticos e dizigóticos foram de grande relevância no estabelecimento da contribuição genética associada ao risco de desenvolvimento da AR. Pesquisas na Finlândia e Reino Unido mostraram taxa de concordância para AR de 12,3% e 15,4% entre gêmeos monozigóticos, respectivamente, comparada a 3,5% e 3,6% entre os dizigóticos. Os dados obtidos possibilitaram aos autores, estimar em 60% a herdabilidade para AR (MacGREGOR *et al.*, 2000).

Embora existam tendências familiares, o padrão de herança é complexo e provavelmente poligênico, ou seja, nenhum gene individual é suficiente para desencadear a doença, existindo a necessidade de que vários genes interajam entre si (PRATT, ISAACS, MATTEY, 2009).

Na década de 70, os genes de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade passaram a ser relacionados à susceptibilidade para a AR. Inicialmente, observou-se que 78% dos pacientes euro-descendentes eram positivos para HLA-DRw4, em relação a 28% dos controles (STASTNY, 1978). Estudos subsequentes buscaram detalhar e identificar os genes e alelos que mais se relacionavam com a doença, caracterizando-se forte associação entre AR e

múltiplos alelos do *HLA-DRB1*, que expressam o epítopo HLA-DR4 (SELDIN *et al.*, 1999). Análises posteriores conduziram à hipótese do *shared epitope* (SE) ou “epítopo compartilhado”. Chama-se epítopo compartilhado a uma sequência de aminoácidos comum a vários alelos associados à doença normalmente na fenda de apresentação de peptídeo (GREGERSEN, SILVER, WINCHESTER, 1987). Indivíduos que possuem dois alelos *HLA-DRB1* diferentes, com epítopos compartilhados, apresentam maior risco de desenvolver AR e expressam a forma mais grave da doença. Complementando, estudos em diferentes populações revelaram forte associação do *HLA-DRB1 SE* e AR em um subgrupo de indivíduos anti-CCP positivos, em contraste aos anti-CCP negativos (HUIZINGA *et al.*, 2005; TEZENAS *et al.*, 2005).

Inúmeros polimorfismos genéticos foram sugeridos como prováveis candidatos envolvidos na ligação com a AR (PLENGE *et al.*, 2005), contudo, somente alguns foram relacionados com sucesso, tal como o gene *PTPN22*, o qual codifica uma proteína intracelular envolvida na ativação do leucócito alvo (BEGOVIĆ *et al.*, 2004). Ainda nesse contexto, outros dois genes de interesse, porém menos envolvidos, são o gene *MHC2TA*, também conhecido como *CIITA*, cujo polimorfismo funcional determina a quantidade de moléculas de MHC tipo II expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) (SWANBERG *et al.*, 2005), e o gene peptidil-arginina-deiminase-4 (*PADI4*), o qual apresenta seu produto envolvido na modificação pós traducional de proteínas, convertendo arginina em citrulina (SUZUKI *et al.*, 2003; BARTON *et al.*, 2005).

De forma similar à maioria das DAI, as mulheres apresentam maior predisposição a desenvolver a AR, sugerindo a participação de hormônios femininos no cenário característico da doença, ao passo que androgênios apresentariam papel supressivo (TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013). No entanto, por fatores não totalmente elucidados, o gênero masculino é o que apresenta maior risco de erosão óssea e curso mais acelerado da doença, enquanto o sexo feminino está associado às consequências estruturais da destruição articular (KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Infecções por microrganismos podem desempenhar papel na etiologia da AR. A principal explicação é a existência de mecanismos de mimetismo molecular.

Também é descrita a associação entre a bactéria *Porphyromonas gingivalis* e a reação inflamatória nas articulações, sendo que esta bactéria possui a peptidilarginina deiminase (PAD), a enzima envolvida na citrulinização da arginina (QUIRKE *et al.*, 2013). Outros microrganismos associados ao desenvolvimento da AR são *Proteus mirabilis*, retrovírus e, principalmente, o vírus Epstein-Barr (LOSSIUS *et al.*, 2012; RASHID, EBRINGER, 2012).

Estudos epidemiológicos já demonstraram relação positiva entre consumo de tabaco e desenvolvimento da AR. O tabagismo está associado à positividade de autoanticorpos característicos da doença e é conhecido por interagir com alelos do HLA-DRB1 SE (PADYUKOV *et al.*, 2004; FARHAT *et al.*, 2011). A exposição à sílica ou ao óleo mineral encontra-se relatada em alguns casos (STOLT *et al.*, 2005; SVERDRUP *et al.*, 2005). Outros fatores ambientais, como o estresse, deficiência de vitamina D e determinadas vacinas também já foram descritos como possíveis fatores desencadeantes do desenvolvimento da AR (LIAO, ALFREDSSON, KARLSON, 2009).

### 3.1.3 Fisiopatogenia da Artrite Reumatoide

O processo inflamatório caracterizado pela infiltração celular nas articulações do paciente com AR conduz a uma proliferação de células conhecidas como sinoviócitos, semelhantes a fibroblastos (FLSs), e também à destruição da cartilagem e tecido ósseo. Embora não tão eficiente no processamento e apresentação do antígeno como as células dendríticas, os sinoviócitos são células da imunidade inata que podem ser responsáveis por iniciar o processo inflamatório dentro da articulação.

Neste contexto, já se demonstrou que sinoviócitos têm a propriedade de apresentarem antígenos para células T, caracterizando a participação dos FLSs na iniciação e propagação da sinovite, onde células do estroma sinovial formam um microambiente favorável à retenção de células inflamatórias, que auxiliam na perpetuação da doença (BURMAN *et al.*, 2005).

Os FLSs expressam, na superfície de sua membrana, uma família de receptores conhecida como *Toll-like receptors* (TLR), os quais estão envolvidos na defesa do hospedeiro. Assim como para o reconhecimento de estruturas específicas



do patógenos invasores, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os TLRs também apresentam uma variedade de ligantes endógenos, que podem surgir de forma transitória na sinóvia saudável. Além disso, os FLSs são capazes de secretar citocinas responsáveis pelo recrutamento e retenção de leucócitos (SACRE *et al.*, 2007).

Entre as células que invadem o tecido sinovial encontram-se os linfócitos T e B, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK). A migração de leucócitos para dentro da sinóvia é regulada por múltiplos processos que envolvem interações entre leucócitos, células endoteliais e moléculas de adesão celular, bem como interações entre leucócitos, quimiocinas e receptores para quimiocinas (IWAMOTO *et al.*, 2008; PABLOS, CAÑETE, 2013).

As células T correspondem ao tipo celular mais abundante na sinóvia de pacientes com AR, sendo a maioria linfócitos T CD4+, embora os linfócitos T CD8+ também estejam presentes e possam apresentar importância fisiopatológica. Em geral, as células T CD4+ *naïves* podem se diferenciar em pelo menos quatro subgrupos funcionais: células Th1, que secretam interferon gama (INF- $\gamma$ ) e são responsáveis pela defesa contra bactérias intracelulares; células Th2, secretoras de IL-4, e direcionadas ao combate de parasitas extracelulares; células Th17, responsáveis na defesa contra bactérias extracelulares; e finalmente, as T regulatórias, ou Treg, cuja função está diretamente envolvida na tolerância e modulação de respostas imunes (KANG *et al.*, 2002; WEAVER *et al.*, 2006).

As células Th17 parecem estar intimamente envolvidas em processos inflamatórios autoimunes em seres humanos. Os linfócitos Th17, que secretam IL-17, são capazes de sobreviver em um ambiente caracterizado pela presença de IL-6, TGF- $\beta$  e IL-23. Assim, por meio de efeitos diretos e indiretos em vários tipos celulares, a IL-17 é capaz de induzir inflamação, angiogênese, osteoclastogênese, lesões ósseas e destruição de cartilagens. Diversos autores demonstraram níveis elevados de IL-17 no sangue e na sinóvia de pacientes acometidos pela AR, com associações entre o nível sinovial desta citocina e o grau de dano articular (ZIOLKOWSKA *et al.*, 2000; KIRKHAM, *et al.* 2006). Além disso, a IL-17 atua ativamente no quadro inflamatório característico da AR e parece exercer papel importante na fase inicial da doença (LI *et al.*, 2013).

Em geral, células da linhagem dos monócitos/macrófagos e os FLSs representam os principais efetores na destruição da cartilagem e do tecido ósseo na AR. O envolvimento dessas células resulta em produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Essas citocinas induzem diminuição da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos, secreção de metaloproteinasas (MMP), e diferenciação de monócitos em osteoclastos (PRATT, ISAACS, MATTEY, 2009).

Outros fatores que podem contribuir para ocorrência da doença estão representados pela ligação antigênica ao TLR, o contato com células T ativadas, a secreção de citocinas, incluindo a IL-17, a ligação de complexos imunes ao receptor da fração Fc $\gamma$ , e a ação de serina proteases secretadas por mastócitos e neutrófilos (FIRESTEIN, 2003). Ocorre a formação do *pannus*, característico da AR, devido a proliferação de tecido sinovial que penetra na cavidade articular e invade a cartilagem e o tecido ósseo (MOELANTS *et al.*, 2013).

Estruturas ectópicas, similares aos centros germinativos, localizadas na sinóvia de alguns pacientes, criam um microambiente organizado com localização ideal para resposta imune humoral. Linfócitos B podem processar e apresentar o peptídeo antigênico para células T CD4<sup>+</sup> pré-ativadas, resultando em resposta adaptativa humoral clássica, ao mesmo tempo em que interações similares envolvendo linfócitos B também podem ativar linfócitos T *naïves* em alguns casos (EDWARDS; CAMBRIDGE; LEANDRO, 2006).

De fato, a interação de receptores de linfócitos B (BCR) e TLR parecem ser suficientes para induzir a ativação de células B e produção de anticorpos independentemente do auxílio de linfócitos T, sendo este um mecanismo comprovado de geração do fator reumatoide (FR) em artrite experimental (PRATT, ISAACS, MATTEY, 2009). Além do FR, uma variedade de outros autoanticorpos no soro e líquido sinovial de pacientes com AR já foi descrita, no entanto, inúmeros estudos demonstraram que a família mais específica de anticorpo corresponde à dos autoanticorpos contra proteínas citrulinadas (ALARCON, ANDRADE, 2007; BOUMANS *et al.*, 2011).

Outros dois candidatos, representando o elo entre a cascata iniciadora de eventos e atividades efetoras finais na patogênese da AR, são os receptores de membrana para fração constante de imunoglobulinas (FcRs) e os componentes do

SC (SJÖBERG *et al.*, 2005). As proteínas do complemento foram inicialmente implicadas na AR humana de maneira indireta, seja pela co-localização de fragmentos de C3 com complexos imunes nas articulações, seja pela demonstração da própria atividade desse sistema através da geração de C5a, ou, ainda, pela redução de concentração de componentes iniciais, tais como C2 e C4, no fluido sinovial de pacientes (JOSE *et al.*, 1990).

A participação da via clássica do SC na AR já se encontra bem estabelecida. Alguns estudos relatam o papel da lectina ligante de manose (MBL) na predisposição e gravidade da doença (SAEVARSDOTTIR *et al.*, 2001; TROELSEN *et al.*, 2007; GOELDNER *et al.* 2014a).

Recentemente, algumas pesquisas demonstraram que a ativação da VA deve ser um passo crítico para o desenvolvimento da AR (JI *et al.*, 2002; TROUW *et al.*, 2009). Este achado, tido inicialmente como surpreendente, é consistente com o fato de que a IgG1 foi o isótipo dominante de anticorpos encontrado em modelos experimentais para artrite inflamatória. Demonstrou-se que a IgG1 monoclonal isolada é capaz de induzir artrite em animais com linfócitos deficientes de receptores. É importante considerar que a IgG1 murina é fraca ativadora da via clássica do complemento (KOUSKOFF *et al.*, 1996; JI *et al.*, 2002). Até algum tempo atrás, o envolvimento do SC na artrite de forma geral era considerado como um reflexo da ativação da via clássica, com exceção da artrite idiopática juvenil. Com o advento dessas novas informações torna-se imprescindível que essas considerações sejam revisadas. O estudo de fatores envolvidos na VA do SC, como o polimorfismo do fator B (BF), pode contribuir na elucidação das variantes genéticas que mais se associam à AR, tanto em pacientes como familiares, tendo em vista que essa via encontra-se intimamente implicada na fisiopatogenia da afecção, como será abordado no item 3.2.2.1.

### 3.1.4 Diagnóstico da Artrite Reumatoide

A urgência no reconhecimento e tratamento da AR com o fim de prevenir maiores danos estruturais, aliada às inúmeras críticas devidas à falta de sensibilidade dos métodos para detecção precoce da doença, levaram a uma reformulação nos critérios diagnósticos estabelecidos em 1987 pelo Colégio

Americano de Reumatologia (ACR) (ALETAHA *et al.*, 2010). Os novos critérios publicados pelo ACR em conjunto com a Liga Européia contra o Reumatismo (EULAR) são direcionados para um diagnóstico precoce da doença em pacientes que se apresentam com sintomatologia de curta duração e visam identificar, entre pacientes com sinovite inflamatória indiferenciada, fatores que melhor discriminem aqueles que apresentam risco elevado para o desenvolvimento de doença persistente ou erosiva, aumentando a sensibilidade e especificidade diagnóstica (VAN DER LIDEN *et al.*, 2011).

O diagnóstico da AR depende da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiológicos, e tem como base um sistema de graduação de sintomas, de acordo com a TABELA 1.

Quando a soma dos itens de A até D resultar num valor igual ou superior a 6, os achados correspondem à AR definida, embora pacientes com valor menor que 6 possam ser retestados e os critérios podem vir a se completar no decorrer do tempo de maneira cumulativa (ALETAHA *et al.*, 2010).

Tecnologias emergentes para quantificação de autoanticorpos, assim como a confirmação de sua utilidade clínica atuam expandindo o papel de marcadores sorológicos no diagnóstico da AR. No entanto, sabe-se que ainda não se dispõem de um único exame específico para tal finalidade (BRAHEE; PIERRE-JEROME; KETTNER, 2003).

Os pacientes são classificados também em relação ao grau de comprometimento para desempenhar suas atividades cotidianas através das classes funcionais da doença (STEINBROCKER, TRAEGER, BATTERMAN, 1949), sendo elas:

- Classe I: o paciente é completamente capaz de executar atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer;
- Classe II: o paciente é capaz de executar atividades profissionais e de cuidado pessoal, porém tem limitações na execução de atividades de lazer;
- Classe III: o paciente é capaz de executar atividades de cuidado pessoal, porém possui limitações em relação às atividades profissionais e de lazer;
- Classe IV: o paciente apresenta limitações para a execução de atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer.

TABELA 1 – CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA AR (ACR E EULAR, 2010)

Critérios	Pontuação
<p>A Envolvimento articular – por envolvimento articular entende-se edema ou sensibilidade à palpação, que pode ser confirmado por exames de imagem. Excluem-se: interfalangeanas distais, primeira carpometacarpiana e primeira tarsometatarsiana.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 articulação grande (cotovelos, ombros, joelhos, coxofemorais e tornozelos) 0</li> <li>• 2-10 articulações grandes (cotovelos, ombros, joelhos, coxofemorais e tornozelos) 1</li> <li>• 1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, segunda a quinta metatarsofalangeanas, interfalangeanas do hálux e punhos 2</li> <li>• 4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, segunda a quinta metatarsofalangeanas, interfalangeanas do hálux e punhos 3</li> <li>• +10 articulações (com pelo menos uma articulação pequena incluída) 5</li> </ul>	
<p>B Sorologia – o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• FR negativo e anti-CCP negativo (valores inferiores ou iguais ao limite fornecido pelo laboratório) 0</li> <li>• FR positivo fraco ou anti-CCP positivo fraco (valores positivos fracos = até três vezes o limite positivo fornecido pelo laboratório) 2</li> <li>• FR fortemente positivo ou anti-CCP fortemente positivo (valores fortemente positivos = três vezes acima do limite positivo fornecido pelo laboratório) 3</li> </ul>	
<p>C Reagentes de fase aguda – o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR e VHS normais 0</li> <li>• PCR ou VHS alterados 1</li> </ul>	
<p>D Duração dos sintomas autorreferidos pelo paciente</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt; 6 semanas 0</li> <li>• &gt; 6 semanas 1</li> </ul>	

FONTE: Adaptado de Aletaha *et al.* (2010).

NOTAS: AR: artrite reumatoide; ACR: Colégio Americano de Reumatologia; EULAR: Liga Europeia contra o Reumatismo; FR: Fator Reumatoide; anti-CCP: antipeptídeo cíclico citrulinado; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação

A avaliação da atividade da doença deve ser realizada, de preferência, até 2 meses antes de atingido o estado de remissão ou baixa de atividade da doença, além de reavaliações a cada 3 meses, sugerindo-se também a repetição de exames radiográficos de mãos, punhos e pés a cada ano (BERTOLO *et al.*, 2007).

Existem diferentes índices para essa avaliação, sendo o índice de atividade de doença – 28 articulações (DAS 28) o mais amplamente utilizado. O DAS-28 emprega uma equação matemática utilizando valores de Escala Visual Analógica de dor (grau 0-10, sendo 0 nenhuma dor e 10 dor extremamente forte), números de articulações doloridas, número de articulações com edema e a velocidade de hemossedimentação (mm/h). Resultados acima de 5,1 indicam atividade alta da

doença; entre 3,2 – 5,1, atividade moderada; de 2,6 – 3,2, baixa atividade; e abaixo de 2,6, doença em remissão (BERTOLO *et al.*, 2007).

### 3.1.5 Fator Reumatoide

Os estudos envolvendo reações imunes na AR são amplamente direcionados à participação dos autoanticorpos. Evidências sugerem que o processo inflamatório é iniciado pela presença do fator reumatoide. Esse anticorpo foi descrito em 1949 como um autoanticorpo humano envolvido no aparecimento da AR (PIKE; SULKIN; COGGESHALL, 1949), e desde então tem sido identificado como uma imunoglobulina geralmente do tipo M (IgM), dirigida especificamente contra um determinante antigênico presente na fração constante (Fc) de IgGs autólogas (MEWAR; WILSON, 2006). A deposição dos complexos imunes do FR ocorre na sinóvia, na qual os mesmos fixam o complemento, reforçando a ativação de células B (CARSON *et al.*, 1977).

O FR era, até pouco tempo, considerado o principal marcador sorológico para AR, apresentando sensibilidade de 68% a 81% e especificidade de 60% a 85%, sendo sua reatividade utilizada para o critério de classificação da doença (DE RYCKE *et al.*, 2004; DEJACO *et al.*, 2006). Contudo, apesar de presente em grande parte dos pacientes, não foi comprovado através de experimentos que ele fosse suficiente para desencadear a AR. É pouco provável que este seja o evento inicial da doença, considerando que aproximadamente 30% dos pacientes não apresentam níveis detectáveis do mesmo. Além disso, este anticorpo tem sido identificado em outras condições autoimunes, bem como na população saudável (LUTTERI; MALAISE; CHAPELLE, 2007).

Em geral, pacientes positivos para o FR apresentam um curso mais agressivo da doença em relação aos negativos, estabelecendo-se assim um valor prognóstico para este autoanticorpo (VENCOVSKY *et al.*, 2003). Isótipos de FR diferentes de IgM já foram associados com manifestações particulares da doença, porém, tais achados ainda não foram aplicados amplamente a testes clínicos (NELL-DUXNEUNER *et al.*, 2010).

A presença do FR-IgA no soro de pacientes com AR encontra-se demonstrada desde 1963, porém, durante anos, o seu estudo recebeu pouca atenção dos pesquisadores. Em 1988, através de um seguimento de pacientes por quatro anos, TEITSSON (1988) demonstrou associação entre a positividade para FR-IgA e a gravidade da artrite erosiva, sugerindo que, no início da doença, o FR-IgA se comporta como melhor marcador preditivo de agressividade, do que os isótipos IgM ou IgG.

Posteriormente, JÓNSSON e colaboradores (1992) reforçaram o valor da investigação de diferentes classes de FR, concluindo que o FR dos isótipos IgA e IgG apresentam maior associação com parâmetros clínicos da AR que o FR-IgM. Os autores observaram ainda, que particularmente para os isótipos IgA e IgG, a elevação na concentração de FR poderia preceder manifestações clínicas da doença. Em 1995, os mesmos associaram os níveis de FR-IgA e MEA (JÓNSSON *et al.*, 1995).

Diante da procura por parâmetros prognósticos para esta doença, pesquisadores avaliaram recentemente alguns pacientes iraquianos com AR, em relação ao nível de atividade da doença avaliado pelo DAS28, presença do FR e achados radiográficos. Os mesmos encontraram uma correlação significativamente positiva entre as mudanças radiológicas nas articulações e os títulos dos diferentes isótipos do FR, ou seja, IgG, IgM e IgA (AHMED; OBAID; MOHAMMED, 2010). No estudo coordenado por Ates e colaboradores (2007), uma análise de regressão múltipla mostrou que o FR-IgA foi a única variável independentemente associada ao dano articular grave. Também se relacionou com envolvimento pulmonar, sugerindo que as concentrações desse isótipo servem como marcador de AR erosiva sendo o mesmo útil no monitoramento da atividade da doença. Alguns estudos destacam a relação entre o FR-IgA e envolvimento pulmonar em pacientes com AR (ATES *et al.*, 2007).

O tabagismo tem um efeito adverso nos pacientes em fase inicial da AR, sendo esse fato possivelmente mediado pelo sistema imune. No entanto, o aumento de FR-IgM isolado não prediz pior prognóstico, a menos que esteja associado com a elevação concomitante do FR-IgA (MANFREDSDOTTIR, *et al.*, 2006).

Estudos mostram associação entre a positividade para o FR-IgA, a presença de anticorpos anti-CCP e títulos de FR-IgM superiores a 50UI/mL (NELL-



DUXNEUNER, 2010). São inexistentes os estudos relacionando a presença desses anticorpos com as variantes alotípicas do fator B da VA do SC.

O FR era o único autoanticorpo incluído nos critérios de classificação do ACR de 1987 (ARNETT *et al.*, 1988) e, embora este seja um biomarcador diagnóstico e prognóstico para pacientes com AR estabelecida, ele pode ser detectado em outras DAI, como a Síndrome de Sjögren, e em várias condições não autoimunes, como doenças infecciosas e até em indivíduos saudáveis. Portanto, o FR não é considerado um marcador útil para o diagnóstico na fase inicial da AR, sendo detectado em menos de 50% dos pacientes com doença recente (TAYLOR *et al.*, 2011).

### 3.1.6 Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado

Os anticorpos específicos para proteínas citrulinadas, quase que exclusivamente detectados no soro de pacientes com AR, reconhecem uma variedade de antígenos citrulinados, incluindo  $\alpha$ -enolase, fibrinogênio, colágeno tipo II e filagrina, e são coletivamente identificados como anticorpos anti-peptídeo citrulinado (ACPA). Altas concentrações dos mesmos têm sido detectadas na AR em tecido sinovial inflamado, e no líquido sinovial sugerindo um possível papel na inflamação da sinóvia (CONRAD *et al.*, 2010).

O teste de ELISA mais frequentemente utilizado para detecção dos ACPA é baseado no peptídeo cíclico citrulinado. Os anticorpos anti-CCP têm demonstrado ser tão sensíveis quanto o FR, porém altamente específicos para AR, sendo mais específicos que o FR na doença em fase inicial (WIILK *et al.*, 2010). Diferentes dados confirmam seu valor preditivo e papel prognóstico. A positividade para o anti-CCP foi incluída como um novo critério sorológico para o diagnóstico da AR em 2010 (ALETAHA *et al.*, 2010; SZODORAY *et al.*, 2010). A detecção de anti-CCP apresenta-se bastante útil para auxiliar no diagnóstico da AR, especialmente em suas fases iniciais, aparecendo precocemente durante a evolução da enfermidade (ALARCON, ANDRADE, 2007; WILLEMZE *et al.*, 2012).

A descoberta do anti-CCP na estratificação do risco para AR foi altamente significativa. De fato, o anti-CCP vem sendo cada vez mais utilizado para a avaliação de pacientes com suspeita da doença (VAN BOEKEL *et al.*, 2002; SUZUKI,

YAMADA, YAMAMOTO, 2007, WILK *et al.*, 2010). Os anti-CCP são anticorpos direcionados contra proteínas que passam por uma modificação pós- traducional conhecida como citrulinização, na qual um resíduo de arginina é convertido em citrulina pela ação da enzima peptidilarginina deiminase (PAD). A arginina é um aminoácido de caráter fortemente básico devido à presença de um grupamento guanidina. A citrulina resultante perde tal característica básica devido a sua natureza neutra (FIGURA 3) (KLARESKOG *et al.*, 2008).

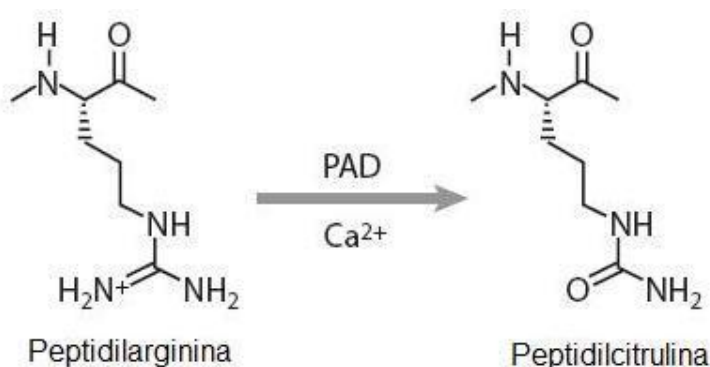


FIGURA 3 - REAÇÃO DE CITRULINIZAÇÃO  
 FONTE: Adaptado de IMBODEM (2009)

A citrulina não é incorporada às proteínas durante a síntese proteica, assim como não é codificada pelo DNA. Portanto, ela só é expressa quando convertida a partir da arginina pela modificação pós-traducional. A citrulinização provoca o desdobramento das proteínas e, portanto altera sua estrutura, assim como sua carga neutra aumenta a hidrofobicidade, resultando possivelmente em um reconhecimento aberrante pelo sistema imune (POULSOM; CHARLES, 2008).

Existem cinco subtipos de PAD descritos. A PAD2 é amplamente expressa nos músculos, no cérebro, no baço e nas glândulas secretoras. Os dois substratos naturais conhecidos da PAD2 são a mielina básica (sistema nervoso central) e a vimentina (músculos e macrófagos). Os níveis de PAD2 parecem ser regulados por hormônios. No útero ela se mostra relacionada com o nível de estrogênios. Sua expressão é três a quatro vezes mais elevada durante a fase estrogênica (TAKAHARA *et al.*, 1989).

O processo de citrulinização de proteínas sinoviais foi demonstrado em modelos murinos com artrite aguda, induzida pela parede celular estreptocócica, e

em artrite crônica, induzida pelo colágeno tipo II (VOSSENAAR *et al.*, 2003). Estudos envolvendo humanos identificaram produtos citrulinados na sinóvia (MASSON-BESSIÈRE *et al.*, 2001) e em sítios de estresse localizados em outros tecidos, como no pulmão de fumantes (MAKRYGIANNAKIS *et al.*, 2008).

Os anticorpos anti-CCP são produzidos na sinóvia reumatoide, sugerindo a presença de proteínas citrulinadas no local. Macrófagos e granulócitos expressam a PAD2, que se encontra inativa em condições fisiológicas normais, devido à baixa concentração de cálcio intracelular. Durante a morte destas células, falham os controles da homeostase e íons cálcio entram nas células, ativando a PAD. Proteínas intracelulares como a histona e a vimentina são então citrulinadas e podem ter acesso ao meio extracelular. A própria enzima PAD pode extravasar e citrulinar proteínas que se encontram fora das células, como a fibrina. Consequentemente, essas proteínas citrulinadas expostas ao sistema imunológico sob condições adjuvantes, como o ambiente inflamatório da sinóvia, podem conduzir a uma resposta imunológica específica, formando anticorpos que reconhecem autoantígenos, devido à quebra da imunotolerância (REPARON-SCHUIJT *et al.*, 2001).

Aproximadamente 50% a 70% dos pacientes com AR apresentam positividade para anti-CCP. Raramente, este anticorpo é encontrado na população saudável (<2%) ou em outras doenças inflamatórias (VAN DER HELM-VAN *et al.*, 2005). Vossenaar, Zendman e Van Verooij (2004) constataram que a presença de proteína citrulinada não é uma característica exclusiva do tecido sinovial reumatoide, sendo encontrada também em vários outros processos inflamatórios articulares. Contudo, o motivo pelo qual na AR acontece resposta imunológica contra epítomos citrulinados ainda permanece desconhecido.

Foi demonstrado que a maioria dos pacientes que apresentam anti-CCP positivo desenvolveram esse marcador previamente às manifestações clínicas inerentes da doença (RANTAPÄÄ-DAHLQVIST *et al.*, 2003; NIELEN *et al.*, 2004). Portanto, o curso da AR é caracterizado por um período de autoimunidade pré-clínica que pode ter anos de duração. (IMBODEN, 2009). Nesse contexto, supõe-se que a imunidade desencadeada contra autoantígenos citrulinados possa ser artritogênica, pois experimentos com animais demonstraram que o colágeno tipo II

(CII) quando citrulinado é mais artritogênico que o CII na sua forma nativa (LUNDBERG *et al.*, 2005).

A especificidade do anti-CCP para AR, a forte associação entre anti-CCP positivo e alelos HLA-DRB1 *SE*, a presença de proteínas citrulinadas nas articulações inflamadas e a presença de anti-CCP previamente à clínica da AR, corroboram a hipótese de que os anticorpos contra antígenos proteicos citrulinados são patogênicos. Todavia, a simples presença desses anticorpos não é suficiente para desencadear a artrite, sendo necessária a ocorrência de fatores adicionais, tais como inflamação articular, que conduz à deposição de fibrina, influxo de células inflamatórias que expressam PAD, ativação do complemento e aparecimento subsequente de epítomos proteicos citrulinados nas articulações dos pacientes (KLARESKOG *et al.*, 2008; TROUW *et al.* 2009).

Somente em pacientes positivos para o anti-CCP foi observado o efeito predominante dos 3 maiores fatores de risco para a doença, o HLA *SE* (HUIZINGA *et al.*, 2005), o gene *PTPN22* (PLENGE *et al.*, 2005) e o tabaco (STOLT *et al.*, 2003). Pelo menos nos casos de HLA *SE*, o fator de risco primário parece ser a presença do próprio anti-CCP, influenciado pelo genótipo, ao invés da presença do *SE* por si mesmo. Demonstrou-se, também, que a exposição ao tabaco confere um risco aumentado para AR em indivíduos *SE* positivos, aparentemente por um mecanismo induzido pelo anticorpo anti-CCP (van der HELM-VAN MIL *et al.*, 2007).

O exato mecanismo que conduz à formação desses anticorpos ainda não se encontra estabelecido, assim como também não se sabe o mecanismo pelo qual este contribui para dano tecidual e inflamação. No entanto, um estudo recente revelou que os anticorpos anti-CCP ativam tanto a via clássica como a via alternativa do sistema complemento (TROUW *et al.*, 2009). Por sua vez, CLAVEL *et al.* (2008) já haviam demonstrado, *in vitro*, que os anticorpos anti-CCP interagem com receptores Fc e ativam células do sistema imune. Analisados conjuntamente, tais dados sugerem que o anti-CCP pode disparar os dois mecanismos efetores mais proeminentes utilizados pelos anticorpos na resposta imunológica.

### 3.1.7 Anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV)

Por sua vez, estudos mais recentes realçaram o bom desempenho diagnóstico de anticorpos específicos para duas outras proteínas citrulinadas, o peptídeo viral citrulinado 2 (VCP2), um peptídeo correspondente à proteína 2 codificada pelo vírus Epstein-Barr (EBNA-2), e a vimentina citrulinada mutada/recombinante. Os anticorpos anti-VCP2 estão em concordância com os anticorpos anti-CCP, com resultados positivos associados ao alto risco de doença erosiva (BIZZARO *et al.*, 2011; PRATESI *et al.*, 2011). A vimentina citrulinada, alvo antigênico dos anticorpos anti-Sa, representa um marcador altamente específico para AR, tendo sido identificada como um bom candidato no diagnóstico da AR (VOSSENAAR *et al.*, 2004).

A vimentina corresponde a um filamento proteico intermediário amplamente expresso na sinóvia, sendo secretado e citrulinado por macrófagos que sofrem apoptose e que estão presentes no microambiente sinovial devido a um *clearance* comprometido (BANG *et al.*, 2007). Assim, a vimentina citrulinada vem sendo considerada um autoantígeno potencial, com possível valor diagnóstico. Testes de ELISA que detectam os anticorpos anti-vimentina citrulinada (anti-MCV) foram desenvolvidos. A pesquisa de anticorpos anti-MCV pode trazer um valor diagnóstico adicional tanto na doença recente, quanto na de longa duração (LUIME *et al.*, 2010).

Autores que investigaram o desempenho diagnóstico dos anticorpos anti-MCV em relação ao FR e ao anti-CCP, reportaram resultados conflitantes. Isso se deve, em parte, à heterogeneidade da população investigada (indivíduos controles ou pacientes com doenças infecciosas ou outra doença inflamatória crônica e em diferentes fases da doença). Tanto em pacientes com AR recente como em doença bem estabelecida, os anticorpos anti-MCV parecem se comportar como um marcador diagnóstico levemente mais sensível que o anticorpo anti-CCP, com 12%-15% dos pacientes anti-CCP negativos sendo positivos para o anti-MCV (LUIME *et al.*, 2010; ROLAND *et al.*, 2008; VAN DER LINDEN *et al.*, 2009). O título de anticorpos anti-MCV em pacientes com AR está relacionado com o nível de atividade da doença (DAS). De acordo com SZEKANECZ *et al.* (2008), o espectro diagnóstico deste teste difere do anti-CCP, pois a detecção de anticorpos anti-MCV

é especialmente útil no diagnóstico de pacientes com sorologia negativa para o FR e anti-CCP.

Por outro lado, os anticorpos anti-CCP têm melhor desempenho em termos de especificidade, especialmente em pesquisas envolvendo pacientes com outras doenças inflamatórias como controles (LUIME *et al.*, 2010; BESADA, NIKOLAISEN, NOSSENT, 2011). Já os anticorpos anti-MCV possuem melhor associação com a atividade e agressividade da doença, além de predizer melhor a resposta a tratamento e progressão radiográfica do que o anti-CCP (SYVERSEN *et al.*, 2010; INNALA *et al.*, 2008; ENGELMANN *et al.*, 2009; URSUM *et al.*, 2008).

Szekanecz *et al* (2008) e Keskin *et al* (2008) sugerem que o uso combinado de ensaios com anticorpos anti-CCP e anti-MCV, ou até mesmo do FR com o anti-MCV, poderiam melhorar o diagnóstico laboratorial da AR em populações de risco, tais como os familiares de pacientes com AR. Desta forma, justifica-se um dos objetivos do presente estudo, tendo-se como expectativa contribuir para a expansão na utilização de anticorpos da família de proteínas citrulinadas, diante da crescente necessidade de desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas (BESADA, NIKOLAISEN, NOSSENT, 2011)

O valor diagnóstico e prognóstico da determinação de anticorpos, isolados ou associados, têm sido alvo de pesquisas (GOLDBACH-MANSKY *et al.*, 2000, BAS *et al.*, 2003, VAN DER LINDEN *et al.*, 2009; AL-SHUKAILI *et al.*, 2012), porém, o valor da associação dos quatro biomarcadores, FR-IgM, FR-IgA, anti-CCP e anti-MCV, não foi reportada até o momento em amostras de pacientes com AR e seus familiares da população do sul do Brasil.

### 3.1.8 Familiares de Pacientes com Artrite Reumatoide

Estudos têm demonstrado a existência da predisposição familiar em diferentes doenças autoimunes sistêmicas ou órgão-específicas. Embora a etiologia da AR permaneça desconhecida, os fatores genéticos estão fortemente associados à doença, sendo esta influência constatada através de inúmeros relatos referentes a gêmeos monozigóticos e familiares de pacientes acometidos (MacGREGOR *et al.*, 2000). Recentemente, as pesquisas têm sido direcionadas para análises de múltiplos casos dentro da mesma família, especialmente quando há mais de um

irmão afetado, e têm auxiliado no mapeamento de genes associados à AR (ARLESTIG *et al.*, 2012; SEONG-KYU *et al.*, 2013).

ROJAS-VILLARRAGA *et al.* (2009), ao avaliarem variáveis associadas com o aparecimento precoce de dano grave nas articulações dos pacientes, verificaram que a história familiar positiva estava consistentemente associada à forma erosiva da doença. Os autores sugerem que pacientes com AR, cuja história familiar seja positiva, possuem chance 200% superior de desenvolver lesão articular substancial, do que indivíduos da mesma faixa etária, sem história familiar. Nesse contexto, o papel da avaliação de doença familiar, investigação de anticorpos anti-CCP e anti-MCV, bem como genotipagem *HLA-DRB1* nos pacientes assumem grande importância, pois o conjunto destes dados pode ser utilizado de forma preditiva em relação à clínica do paciente, além de direcionar intervenções terapêuticas.

Pesquisas em populações nativas norte-americanas encontraram positividade de 19% para o anti-CCP em familiares saudáveis de pacientes com AR (INBODEM 2009), enquanto estudos na população brasileira, em Curitiba, demonstraram positividade de 5,5% nos mesmos, o que ressalta a caracterização desses indivíduos como grupo de risco para o desenvolvimento da doença e a influência étnica no desenvolvimento destes auto-anticorpos (GOELDNER *et al.*, 2010a).

Uma análise prospectiva realizada com familiares de primeiro grau de pacientes com AR revelou que os mesmos apresentam alta prevalência para os fatores genéticos de risco e para os autoanticorpos relacionados à afecção. A associação do FR com articulações sensíveis e elevados níveis de anti-CCP sugerem que esses auto anticorpos se apresentam como marcadores intermediários da autoimunidade relacionada a AR neste grupo de indivíduos (KOLFENBACH *et al.*, 2009; GOELDNER *et al.*, 2010a).

Apesar de alguns estudos proverem (1) fortes evidências de que pacientes com história familiar de AR são mais susceptíveis à progressão da doença na sua forma erosiva (ROJAS-VILLARRAGA *et al.*, 2009); (2) de se estimarem aproximadamente 5%, o risco para o desenvolvimento da AR entre pais e filhos de pacientes, e em 2%, entre familiares de segundo grau (HARNEY, WORDSWORTH, 2002); (3) de se demonstrar 19% de positividade para o anti-CCP entre familiares (IOAN-FACSINAY *et al.*, 2008), ainda se tem limitações para afirmar de forma definitiva, quais são os traços que caracterizam os indivíduos de risco. Uma dessas

limitações é o fato dos estudos não disporem de amostras bem caracterizadas em relação aos aspectos clínicos, sorológicos e demográficos dos participantes.

Até o momento, são inexistentes os relatos mostrando relação entre a variabilidade alotípica de BF em familiares de pacientes com AR. A determinação do polimorfismo de BF, bem como a associação das variantes alotípicas de BF com o FR-IgA, FR-IgM, anti-CCP e anti-MCV nos pacientes com AR e familiares são relevantes em diferentes populações, como a do sul do Brasil. A realização da presente investigação visa contribuir para uma maior compreensão do processo etiopatogênico da AR, considerando-se os resultados da associação entre BF e o perfil sorológico, assim como aspectos clínicos destes indivíduos.

### 3.2 SISTEMA COMPLEMENTO

O SC é um componente essencial da imunidade inata e também apresenta um importante papel na modulação da imunidade adaptativa. Ele corresponde a um conjunto de proteínas plasmáticas e de superfície celular que participam da defesa contra microrganismos, além de ser o principal mediador humoral do processo inflamatório. Sua ativação contribui na patogênese de várias condições autoimunes e inflamatórias. Esse complexo sistema está envolvido na resposta imunológica ao promover a quimiotaxia das células inflamatórias, aumento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, participação na ativação de células B e T, e remoção de imunocomplexos (IC) circulantes e células apoptóticas (BALLANTI *et al.*, 2011).

As proteínas do SC são produzidas principalmente no fígado e são encontradas no plasma, na sua forma inativa. Para que o SC exerça suas funções, este deve ser ativado, originando fragmentos com diferentes características e funções. A ativação ocorre de forma rápida, após influência de estímulo específico, seguido de uma cascata de autoamplificação. São reconhecidas três vias principais de ativação: a clássica, a das lectinas e a alternativa (TRINDADE *et al.*, 2008).

A ativação da via clássica compreende quatro fases: ligação, ativação, amplificação e destruição. A fase de ligação é iniciada quando C1q do complexo C1 se liga à porção Fc de um anticorpo do tipo IgG ou IgM. Este complexo é composto de uma subunidade de C1q, associada a duas moléculas de C1r e duas de C1s, através de ligações dependentes de cálcio. As esterases C1r e C1s são necessárias



para a fase de ativação. As moléculas C1s, uma vez ativadas, clivam e ativam C4 e C2. Os fragmentos C4b e C2a formam o complexo da C3 convertase (C4b2a) (GÁL *et al.*, 2009).

Cada molécula de C1 ativada gera muitos fragmentos de C4b e C2a. A maior parte dos fragmentos C4b atua como opsonina, outros na formação da C3 convertase, que gera muitas moléculas de C3 ativadas (C3b) (fase de amplificação). Quando depositadas na célula alvo, algumas moléculas C3b atuam como opsoninas, enquanto outras formarão a C5 convertase (C4b2a3b) (FIGURA 4). Esta, ao clivar C5, leva à formação do complexo de ataque à membrana (MAC), composto de C5b-9. A formação do MAC determina lise osmótica das células eritrocíticas e consiste em uma interação proteína-proteína, não requerendo clivagens proteolíticas (FIGURA 5). A ativação de C5 libera ainda o C5a, uma potente anafilotoxina (ATKINSON 2005; LISZEWSKI; ATKINSON, 2007; TRINDADE *et al.*, 2008).

A via das lectinas é iniciada por proteínas plasmáticas, dependentes de cálcio, denominadas lectina ligante de manose (MBL), colectina 11 e ficolinas, com similaridade funcional a C1q. A MBL liga-se a uma grande variedade de açúcares, tais como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetil-manosamina, fucose e glucose, expressos por diferentes microrganismos e estruturas celulares, mediando a fagocitose e a ativação do SC (CHEN; DAHA; KALLENBERG, 2010). Essa ligação leva à ativação de serina proteases associadas à MBL (MASP-1 e MASP-2), que correspondem funcionalmente a C1r e C1s, com subsequente clivagem de C4 e C2. Na sequência, o processo de ativação é similar ao da via clássica (FIGURAS 4 e 5) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; LISZEWSKI; ATKINSON, 2007).

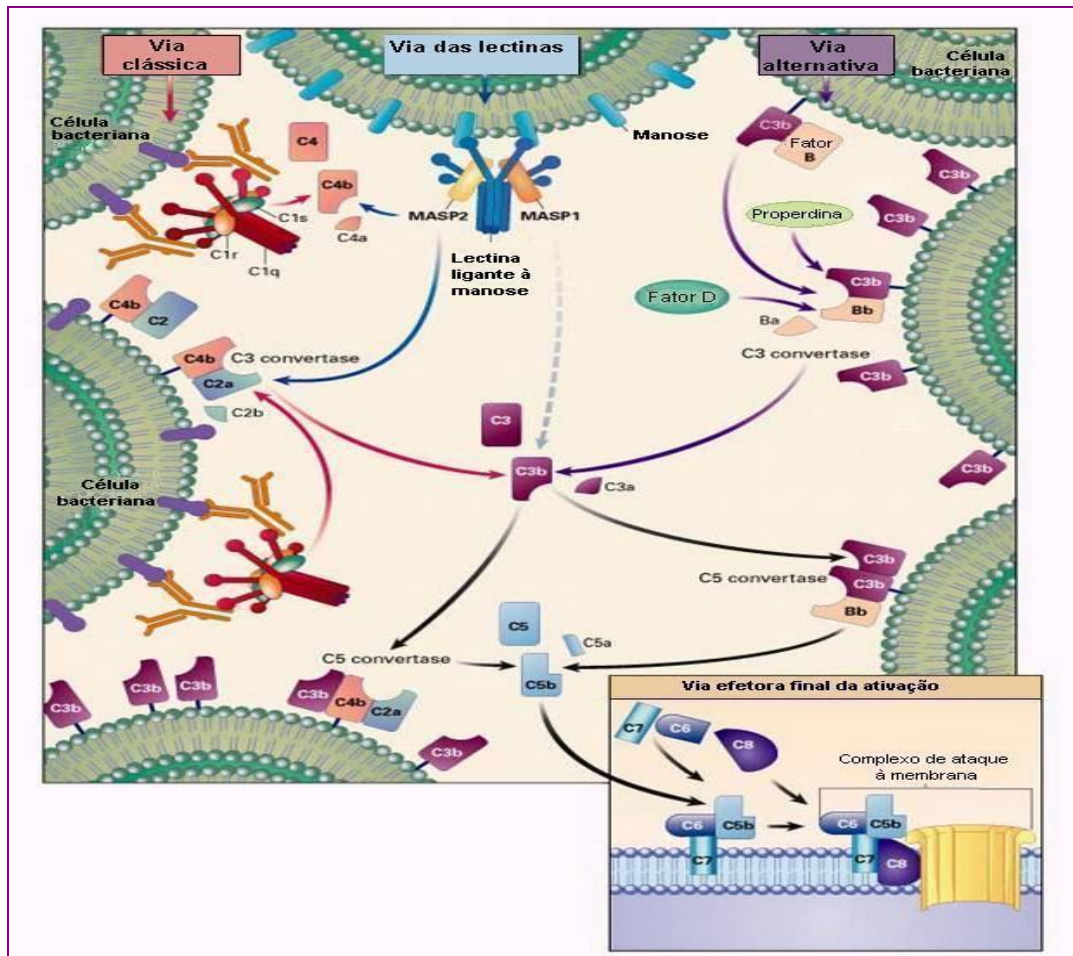


FIGURA 4 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO (SC)

FONTE: Adaptado de WALPORT (2001).

NOTA: Para mais explicações, vide texto.

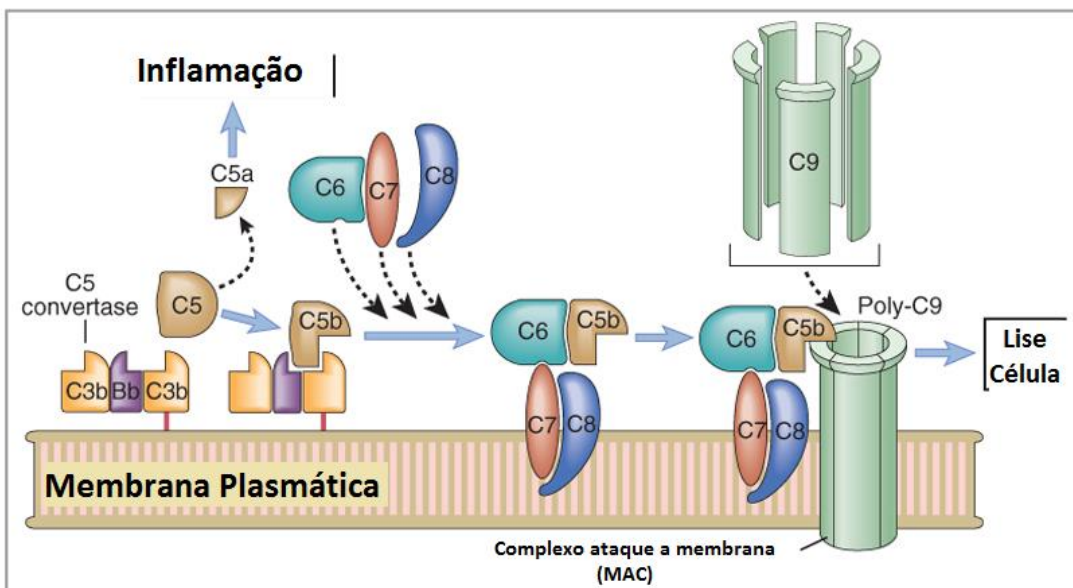


FIGURA 5 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (MAC)

FONTE: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008).

NOTA: Para mais explicações, vide texto.

### 3.2.1 Via Alternativa e o Fator B

Em 1954, PILLEMER e colaboradores<sup>1</sup>, citados por LISZEWSKI e ATKINSON (2007), demonstraram que o complemento podia ser ativado por outros agentes, além do complexo antígeno-anticorpo, ao evidenciar que a incubação de soro não imune (sem anticorpos) com polissacarídeos como o zimosan levava ao consumo do complemento. Esta representa a via mais antiga da imunidade inata, não necessitando de contato prévio com microrganismo, para sua ativação.

A ativação da VA pode ocorrer pelo contato com muitos tipos de estruturas complexas de carboidratos presentes na superfície de bactérias, leveduras e parasitas multicelulares. É também ativada por complexos antígeno-anticorpo que contenham IgG ou IgA polimérica, além de materiais sintéticos (KANG *et al.*, 2009).

O fator B é uma pró-protease que após a montagem e proteólise resulta na formação do complexo C3bBb, o qual amplifica a resposta do SC pela ativação da VA. A estrutura do fator B consiste em três domínios N-terminal de proteínas de controle do complemento (CCP), uma hélice  $\alpha$ L (que forma o pró-peptídeo Ba), um domínio central de vonWillebrand tipo A (VWA) e um domínio de serino protease C-terminal (SP), o qual forma o peptídeo Bb (MILDER *et al.* 2007). O domínio VWA possui um sítio de adesão dependente de íons metálicos (MIDAS), tais como o  $Mg^{2+}$  (MILDER *et al.* 2007) (FIGURA 6).

O fator B tem papel central na ativação da VA, sendo originalmente descrito como uma glicoproteína II rica em glicina, apresentando dois fragmentos de conversão: GAG (Ba) e GGG (Bb). A molécula BF consiste em uma serina protease de cadeia simples (93 KDa), homóloga a C2, com concentração plasmática de 200 $\mu$ g/mL. O fragmento menor, Ba (30-40 KDa), constitui a região amino-terminal de BF e o fragmento Bb (60-70 KDa), a região carbóxi-terminal da molécula (VOLANAKIS, 1998). A ligação de BF ao C3b envolve múltiplos sítios da molécula, que servem como sítios catalíticos das C3 e C5 convertases da VA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

<sup>1</sup>PILLEMER, L. *et al.* The properdin system and immunity. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**, v. 120, p. 279-285, 1954.

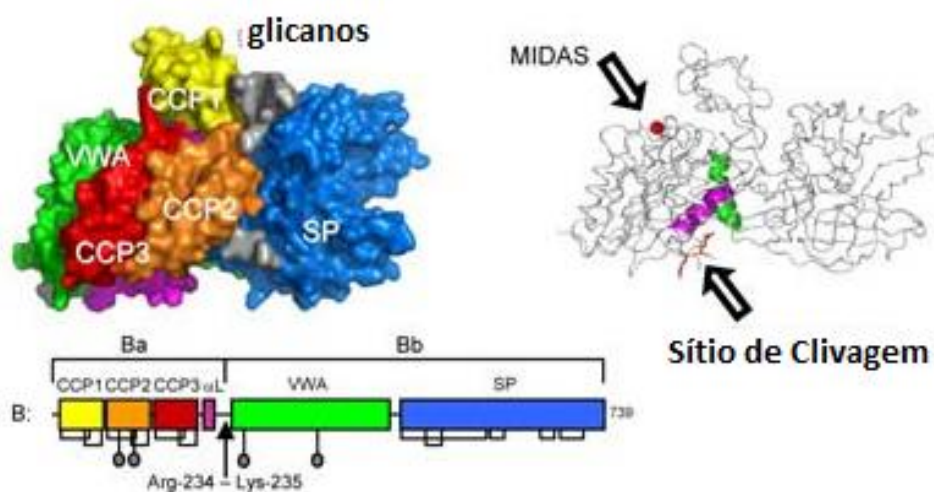


FIGURA 6 – PRÓ ENZIMA NATIVA FATOR B

FONTE: Adaptado de MILDNER *et al.*, 2007.

NOTA: Para mais explicações, vide texto.

A ativação da VA não é iniciada por uma molécula de reconhecimento específica, tal como C1q ou MBL/ficolinas, correspondentes à via clássica e das lectinas, respectivamente. Ao invés disso, a VA depende da hidrólise espontânea, em baixos níveis de C3 no plasma, para formar a molécula C3i ou C3(H<sub>2</sub>O), de conformação semelhante a C3b (C3b *like*) (LACHMANN, 1992). Este complexo, bem como o C3b gerado pela via clássica, pode se ligar ao BF numa reação dependente de magnésio, formando os respectivos complexos C3(H<sub>2</sub>O)B e C3bB. A clivagem do fator B pelo fator D origina o fragmento Bb, que juntamente com o C3b vai dar origem à C3 convertase da VA (C3bBb) (FIGURA 7).

C3bBb é bastante instável, e o fragmento Bb se dissocia de C3b com tempo de meia vida de 2-3 minutos. A properdina, entretanto, desacelera a dissociação do complexo (FARRIES, LACHMANN, HARRISON; 1988) e atua como um regulador positivo da atividade do complemento. Sugere-se que a properdina possa se unir primeiramente ao C3b que está ligado à superfície celular, e com isso acelerar a ligação do FB ao C3b, para formar o complexo C3bBP (FIGURA 8). O fator B pode então ser clivado pelo fator D gerando C3bBbP, a C3 convertase estabilizada. No entanto, alguns estudos têm sugerido que a properdina possa ser uma molécula que



A ativação do SC é pró-inflamatória e pode ser potencialmente deletéria para o organismo. Assim sendo, aproximadamente metade das proteínas do complemento é destinada à regulação desse sistema. Em condições de doença, a ativação do SC contribui para dano celular e tecidual. Na VA, a união dos componentes das convertases (C3 e C5) ao C3b depositado na superfície celular é inibida pela ligação de uma proteína plasmática reguladora, o fator H. O fator H impede a ligação de Bb ao C3b (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Nas superfícies não ativadoras, tais como as membranas das células do hospedeiro, a ligação do fator H é promovida pela sua afinidade a resíduos carregados negativamente, como moléculas de ácido siálico. Sua presença na porção carboidrato das glicoproteínas permite que C3b ligado às células do hospedeiro ligue-se rapidamente ao fator H, com subsequente clivagem pelo fator I. O fator H também dissocia o complexo C3bBb que se forma nas superfícies não ativadoras ou que estão presentes na fase fluída (PRODINGER *et al.*, 1999; UTIYAMA; MESSIAS-REASON; KOTZE, 2004).

Concentrações aumentadas de complemento são comumente detectadas em situações inflamatórias. Elevações de C3, C4 e BF representam aumento na síntese hepática, como parte da resposta de fase aguda. Níveis reduzidos de complemento podem ocorrer em doenças relacionadas à deposição de complexos imunes circulantes ou à presença de autoanticorpos (IgG e IgM), que podem levar à hipocomplementemia adquirida. Além disso, deficiências genéticas do complemento podem predispor a DAI (TRINDADE *et al.*, 2008).

Os produtos de clivagem do complemento como C3a e C5a apresentam papel marcante nessa cascata inflamatória. Estes apresentam função quimiotática e ativadora de neutrófilos e macrófagos em processos inflamatórios, através da interação com receptores de C3a e C5a. A properdina, liberada de neutrófilos, amplifica a cascata inflamatória através da estabilização da convertase gerada pela VA. A ativação do SC também exerce importante papel inflamatório em doenças mediadas por IC, como glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite nefrotóxica, LES e AR, entre outras (YAMAMOTO; PORTINHO, 2001; BOTTO *et al.*, 2009).

Considerando que o SC corresponde a um mediador central da inflamação, este é reconhecido como alvo terapêutico em potencial, com estudos recentes em destaque na AR (TROUW *et al.*, 2009). Anticorpos monoclonais (anti-C5) foram



desenvolvidos para bloquear a etapa final de ativação, comum às três vias desse sistema (LISZEWSKI; ATKINSON, 2007; SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009).

### 3.2.1.1 Polimorfismo de BF e implicações clínicas

Os avanços ao nível molecular têm facilitado a caracterização dos alelos do complemento. Tanto a caracterização fenotípica das variantes proteicas (alotipagem), como a caracterização genômica do DNA (genotipagem), são usadas correntemente (PRODINGER *et al.*, 1999). Os alelos compreendem as variações de um mesmo gene e diferem entre si por pequenas mudanças na sequência de seus nucleotídeos. Esses ocupam o mesmo *locus* gênico em cromossomos homólogos e são os responsáveis por uma dada característica. O fenótipo consiste no conjunto de características visíveis ou detectáveis em um indivíduo ou organismo e é determinado pelo seu genótipo e pelas condições ambientais. As diferenças fenotípicas detectadas por métodos imunológicos são denominadas de aloantígenos, enquanto as diferenças por carga e/ou peso molecular, detectadas por métodos eletroforéticos, são denominadas variantes eletroforéticas ou fenótipos.

Polimorfismo é o termo com o qual se designa uma mutação, cujo alelo menos comum tem frequência igual ou superior a 1% na população. Existem evidências de polimorfismo genético para a maioria dos componentes do complemento, seja da via clássica, alternativa e das lectinas, assim como para proteínas regulatórias solúveis e de membrana, além de receptores do complemento (RITTNER, 1992; BRAI; ACCARDO; BELLAVIA, 1994; THIEL *et al.*, 2009; OKEMEFUNA *et al.*, 2010; SEITSONEN *et al.*, 2010).

A fenotipagem (alotipagem) dos componentes do complemento pode ser determinada por alterações no peso molecular, mobilidade eletroforética, ponto isoelétrico e atividade funcional das diferentes variantes. O método mais utilizado para sua detecção é a da diferença de cargas elétricas, através de eletroforese em gel de agarose sob alta voltagem, que é o método básico para a separação das variantes. O gel específico e o sistema tampão variam para cada componente e anticorpos monoclonais permitem distinguir diferentes alótipos. (Mc LEAN; WINKELSTEIN, 1984; RITTNER; SCHNEIDER, 1988). A genotipagem é realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática e

análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFPL) ou por sequenciamento (RITTNER, 1992; PRODINGER *et al.*, 1999).

Os componentes C2, C4 e BF são codificados por genes localizados na região de classe III do MHC, no braço curto do cromossoma 6, e são herdados como uma só unidade, denominada complótipo (LAMBRIS; SAHU; WETSEL, 1998).

O polimorfismo de BF foi detectado por eletroforese de alta voltagem em gel de agarose, e subsequente imunofixação com um anticorpo anti-fator B humano (ALPER; BOENICH; WATSON, 1972). Na descrição inicial, foi demonstrada a existência de dois alótipos comuns do fragmento Ba, BF\*S e BF\*F, e outros mais raros, do fragmento Bb. O polimorfismo de BF consiste em duas variantes principais, F e S, e duas menos frequentes, F1 e S07, além de, aproximadamente, 18 variantes raras. A distância entre o alótipo S e a variante F1 foi escolhida como distância referência (FIGURA 9) (GESERICK *et al.*, 1990).

A atividade hemolítica é máxima para BF\*F, seguida de BF\*SF e BF\*S. A ocorrência de alelos nulos de BF (BF\*Q0) é extremamente rara, sugerindo que a ativação de C3 pela VA seja de maior importância biológica, do que sua ativação pela via clássica (RITTNER, SCHNEIDER, 1988), não se tendo relatos de deficiência homozigótica do mesmo (RITTNER, 1992).

Polimorfismos comuns em componentes da VA têm sido relacionados à algumas doenças. Destacam-se três variantes polimórficas comuns do BF, as quais diferem na posição 32 no fragmento Ba ou o aminoácido 7 da proteína madura; BF<sub>32R</sub>, BF<sub>32Q</sub>, e BF<sub>32W</sub>; correspondendo a rs12614 e rs641153) (ABBAL *et al.*, 1985). Das quatro combinações de bases possíveis, três são existentes, com a combinação de ambos alelos principais resultando em arginina (R) e as demais combinações formarão glutamina (Q) e o triptofano (W) (HUGHES; MULLAN; BRADLEY, 2011). O BF<sub>32R</sub> foi originalmente descrito como BF\*S, sendo o alótipo mais comum entre os eurodescendentes, com frequência alotípica de 0,71. Esta frequência se encontra próxima de 0,80 em orientais e varia de 0,28 a 0,44 entre os afrodescendentes. Além disso, o alótipo BF\*F foi definido como BF-FA (BF<sub>32Q</sub>, frequência alotípica 0,05) e BF-FB (BF<sub>32W</sub>, frequência alotípica 0,16) (ALPER; BONICH; WATSON, 1972; MAUFF; GAUCHEL; HITZEROTH, 1976; TOKUNAGA, *et al.*, 1982; DAVRINCHE; ABBAL; CLERC, 1990).



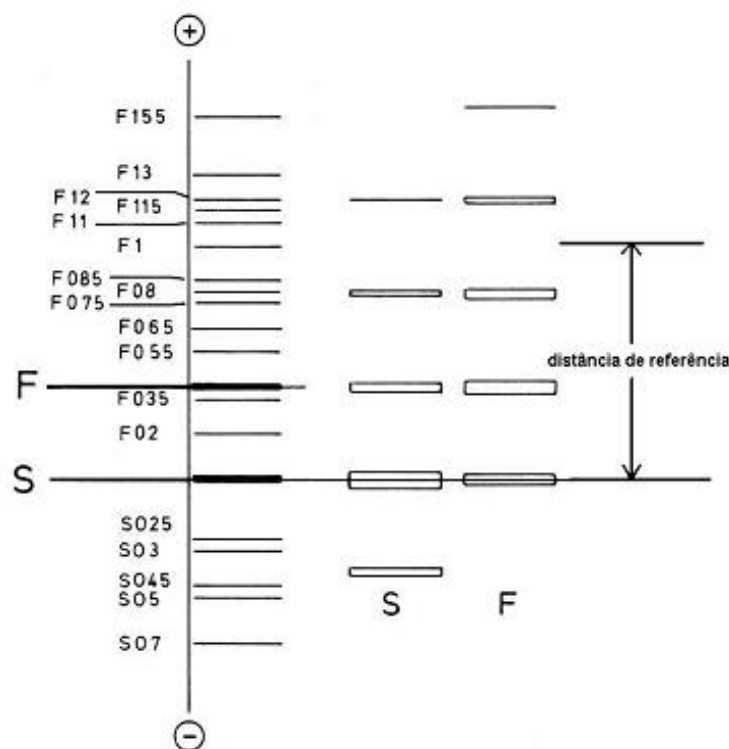


FIGURA 9 - VARIANTES POLIMÓRFICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE ALTA VOLTAGEM  
FONTE: Adaptado de GESERICK *et al.* (1990).

Comparada à variante 32Q do FB, a variante 32R apresenta até quatro vezes mais afinidade pelo C3b, aumentando a formação da enzima C3 convertase e, consequentemente, a atividade lítica do SC (MONTES *et al.*, 2009). Em relação à mobilidade eletroforética, tem-se que quanto mais positiva a constituição da variante, menor será a afinidade da mesma pelo pólo oposto da cuba de corrida eletroforética, diminuindo sua velocidade de migração. Este é o caso de BF\*S, de migração lenta (resíduos de arginina), em relação à BF\*F, de migração rápida (resíduos de glutamina) (MONTES *et al.*, 2009, HUGHES, MULLAN, BRADLEY, 2011).

Variantes com mobilidade muito rápida ou muito lenta são raras na maioria das populações, com poucas exceções, como em populações que tenham passado por longos períodos de isolamento geográfico e étnico. Como exemplo tem-se a população basca, em que o alótipo BF\*F1 atinge uma frequência de 0,126 (DE MOUZON, *et al.* 1979).

Embora o BF apresente um polimorfismo limitado em comparação ao de C4 e aos antígenos de classe I e II do MHC, as variantes alotípicas de BF representam importantes marcadores de susceptibilidade genética a doenças. O BF S e BF F têm

sido associado com diferentes doenças, incluindo a susceptibilidade a infecções por patógenos, como por *Trypanosoma cruzi*, na qual o BF S apresenta uma papel protetor em relação à cardiomiopatia relacionada à Doença de Chagas (MESSIAS-REASON; URBANETZ; PEREIRA-DA-CUNHA, 2003).

Diversos estudos evidenciaram um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus insulino-dependente em indivíduos que apresentem o alótipo BF\*F1, podendo representar um marcador de susceptibilidade, especialmente em pacientes pediátricos (ALLANNIC *et al.*, 1985; MISIANO *et al.*, 1989). Os estudos de DE MOUZON *et al.* (1979), no entanto, ressaltam que o haplótipo associado à doença, HLA-B18 C2\*C BF\*F1 C4A\*3 B\*Q0, envolvendo um alelo nulo no *locus* C4B, não permite firmar se BF\*F1 representa uma associação primária ou secundária com a doença, embora o desequilíbrio de ligação entre HLA-B18 e BF\*F1 seja mais forte nos pacientes do que nos controles. O alótipo BF\*F1 pode estar envolvido, também, na nefropatia membranosa idiopática (DYER *et al.*, 1980).

Na literatura há outros estudos de associações do polimorfismo de BF com doenças, tais como com espondilite anquilosante (MIGONE *et al.*, 1978), esquizofrenia (FANANAS *et al.*, 1992), doença celíaca (UTIYAMA; KOTZE; MESSIAS-REASON, 2005) e degeneração macular (MONTES *et al.*, 2009), entre outras. Os raros estudos de associação entre o polimorfismo de BF e AR serão comentados no item 3.2.2.2.

### 3.2.2 Sistema Complemento e Artrite Reumatoide

A inflamação nas articulações em AR é um processo complexo. Evidências decorrentes de experimentos em modelos animais e de estudos clínicos determinando diferentes produtos da ativação do complemento demonstraram que esse sistema contribui para o desenvolvimento da doença (NEUMANN *et al.*, 2002; LOW; MOORE, 2005). Em geral, a cascata do complemento está envolvida na indução e progressão de reações inflamatórias (MORGAN, 2000; RICKLIN *et al.*, 2010).

Embora o complemento seja considerado um componente sérico, suas proteínas podem ser encontradas em altas concentrações no líquido sinovial. Durante a lesão da cartilagem, o complemento do líquido sinovial é exposto a

componentes da matriz extra-celular, que são liberados da cartilagem por proteinases. Possivelmente, moléculas presentes na cartilagem, ou liberadas pela mesma, podem ter papel relevante na propagação da inflamação e ativação do SC. Uma resposta equilibrada do SC frente aos componentes da matriz extra-celular poderia ser suficiente para manter um ambiente não inflamatório. Contudo, na artrite, quando diversas estruturas extra-celulares se tornam expostas, além de outros ativadores do SC presentes, incluindo células apoptóticas e autoanticorpos, o balanço entre ativação e inibição do SC pode favorecer mais a ativação. Esse fato resulta na maior liberação de C5a e geração do MAC, contribuindo assim para um intenso processo inflamatório (OKROJ *et al.*, 2007).

Algumas proteínas da matriz extra-celular ativam o complemento, ao passo que outras atuam como inibidores locais. O balanço final dependerá de condições locais, tais como a extensão da fragmentação de peptideoglicanos durante a destruição tecidual, e a disponibilidade dos sítios de ligação (SJÖBERG *et al.*, 2005; SJÖBERG *et al.*, 2009).

Evidências da participação de componentes da cascata do complemento no processo etiopatogênico da AR são reforçadas por diferentes estudos que demonstram a ativação e interação das três vias deste sistema. Independente da via envolvida, todas refletem a indução e progressão de reações inflamatórias. Apesar de a relação entre a positividade para o FR e o desenvolvimento da AR não estar totalmente esclarecida, sabe-se que a presença de agregados de IgG ou de complexos de IgG-FR, podem ativar o SC (TURESSON, MATTESON, 2009). A deficiência de MBL predispõe à forma erosiva da AR (GRAUDAL *et al.*, 2000; JACOBSEN *et al.*, 2001) e baixos níveis séricos desta lectina, em pacientes com AR, estão associadas a complicações decorrentes de infecções (GARRED *et al.*, 2000; GOELDNER *et al.*, 2014). O interesse pela participação da VA na AR tem sido tema recente e de relevância no diagnóstico e terapêutica da doença (TROUW *et al.*, 2009; HAPPONEN *et al.*, 2012).

### 3.2.2.1 Via alternativa e artrite reumatoide

A participação da VA na fisiopatogenia da AR não se encontra totalmente estabelecida, e recentemente, tem sido explorada em algumas populações (LOW; MOORE, 2005; MONACH *et al.*, 2007; TROUW *et al.*, 2009; HAPPONEN *et al.*, 2012). A ativação desta via era relacionada até então apenas com a superfície de microrganismos, no entanto, o possível envolvimento da mesma, na AR, tem se explicado pela formação e estabilização de fragmentos C3b ligados à superfície celular (JI *et al.*, 2002).

O C3 circulante no soro é constitutivamente clivado em C3a e C3b. Uma ponte tioester da molécula é susceptível a constante hidrólise, gerando a molécula C3i ou C3(H<sub>2</sub>O), que tem conformação semelhante ao C3b (C3b *like*). Tanto o C3b livre quanto o C3i são proteínas de meia vida curta devido à inativação que sofrem pelo fator H e pelo fator I. Entretanto, C3b pode se ligar a IgG do complexo imune e formar assim complexos C3b<sub>2</sub>-IgG, os quais se ligarão a superfície celular e servirão de suporte para formação das C3 e C5 convertases (VIVANCO *et al.*, 1999).

Fazendo parte do complexo C3b<sub>2</sub>-IgG está a properdina, cuja ligação induz a participação do fator B, ativando a VA. O neutrófilo é o principal produtor de properdina e também está entre as células primariamente presentes nas lesões articulares da AR. Sem a presença dos neutrófilos, a lesão não se desenvolve. Portanto, o recrutamento dessas células para o local da inflamação faz-se necessário (WIPKE, ALLEN, 2001). O fragmento C5a do SC é uma potente anafilotoxina e a interação da mesma com seu receptor (C5a-C5aR) é crítica em modelos animais de artrite inflamatória. A fração C5a exerce atividade quimiotática sobre os neutrófilos, assim como estimula a degranulação dos mesmos (JI *et al.*, 2002). Dessa forma, através da produção de properdina, os neutrófilos poderiam amplificar fortemente a ativação da VA, assim como o BF ou componentes adicionais de C3 também são capazes (SCHWAEBLE; REID, 1999).

Em geral, as células do próprio organismo encontram-se protegidas do efeito lesivo do SC pela presença de moléculas regulatórias que são expressas na membrana celular, tais como CD46, CD55, CD35 e CD59, ou, ainda, por algumas proteínas secretadas como C4BP, fator H-like 1 (FHL-1) e fator H (PRODINGER *et al.*, 1999; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Se na AR a via clássica representa um importante ativador do SC, presumivelmente através da ligação de complexos imunes contendo FR, a VA também exerce seu papel, sendo ativada na sinóvia de pacientes com a doença. A comprovação a participação da VA é feita pela diminuição na concentração do fator B e de properdina no fluído sinovial e aumento nos níveis de Ba (EL-GHOBAREY; WHALEY, 1980).

Diferentes ensaios em sangue periférico sugerem a ativação da VA como a principal contribuinte na patogênese da artrite idiopática juvenil (AIJ) (BANDA *et al.*, 2006; BRUNNER *et al.*, 2012). Corroborando, Aggarwal e colaboradores (2000) verificaram a ativação da VA com a formação do complexo de ataque à membrana em pacientes com AIJ, conduzindo potencialmente a destruição das articulações. Além disso, em 2002 foi demonstrado que camundongos deficientes de C3 ou fator B, e que foram imunizados com colágeno bovino tipo II, exibiram redução ou quase ausência clínica e histológica de artrite verificável. Esses resultados sugerem que a via clássica e possivelmente também a VA estejam envolvidas na patogênese da artrite induzida por colágeno (HIETALA *et al.*, 2002).

Explorando a participação da VA na AR, surgiram diversas pesquisas na busca por novos marcadores sorológicos para a doença, sendo um deles a dosagem da proteína de matriz de cartilagem oligomérica (COMP) no soro ou fluído sinovial de pacientes. COMP é um componente estrutural da cartilagem, sendo liberado durante doenças articulares erosivas tais como AR e osteoartrite (SAXNE; MÅNSSON; HEINEGARD, 2006).

Happonen e colaboradores (2010) mostraram que a COMP liberada das articulações durante a AR é capaz de ativar SC tanto *in vitro* como *in vivo*. De fato, o complexo COMP-C3b é encontrado no soro e fluído sinovial de pacientes com AR, ao passo que nenhum complexo COMP-C3b foi mensurado nos indivíduos saudáveis, sugerindo que a identificação desse complexo pode ser uma ferramenta diagnóstica para AR (HAPPONEN *et al.*, 2012).

A descrição recente da ativação da VA por anticorpos anti-CCP foi abordada cientificamente como surpreendente e inesperada, pois até pouco tempo tinha-se uma visão tradicional de que anticorpos IgM e IgG multivalentes poderiam ativar o SC somente pela via clássica. A descoberta de que diferentes formas glicosiladas de IgG, IgM e IgA também podem ativar a VA ou a via das lectinas chamou atenção

pela possibilidade de desenvolver terapias visando a inibição de danos mediados pelo SC na AR (ARNOLD *et al.*, 2005; TROUW *et al.*, 2009).

Corroborando o envolvimento da VA na AR, foi demonstrada a presença da properdina em modelos animais com anti-CCP positivo, sendo esse fato interessante do ponto de vista de relatos atuais que a descrevem como uma molécula de reconhecimento, tal como C1q ou MBL, além do seu papel na estabilização da C3 convertase da VA (SPITZER *et al.* 2007; KEMPER *et al.*, 2008). Experimentos utilizando animais, deficientes em algumas proteínas do SC (BANDA *et al.*, 2006) ou com um inibidor específico da VA (KATSCHKE *et al.*, 2007), forneceram claras evidências que a VA em particular, e não a via clássica, é a responsável por danos em órgãos de camundongos com artrite.

Contudo, o SC exerce um papel complexo na fisiologia humana, pois a ligação do complemento a IC pode prevenir a precipitação dos mesmos ou atuar de forma a solubilizá-los. Porém, quando a ativação do SC resulta na ligação desses complexos em tecidos saudáveis, a consequência pode ser danosa. Portanto, resta ainda esclarecer se a ativação da VA por anti-CCP contribui para lesão tecidual, ou se representaria um benefício pelo fato do SC estar diretamente envolvido na eliminação de IC (TROUW *et al.*, 2009).

### 3.2.2.2 Polimorfismo de BF na artrite reumatoide

O envolvimento dos alótipos de BF na susceptibilidade da AR tem sido descrito em algumas populações. WATZKO e MESSIAS (1994), no Brasil, observaram diminuição significativa na frequência de BF SF em pacientes com AR classe funcional III e IV, assim como outros autores em diferentes populações (DAHLQVIST *et al.*, 1985; DYER *et al.*, 1985). Aumento na frequência do alótipo BF S em pacientes do sexo masculino com história familiar de poliartrite foi descrito por DAHLQVIST *et al.*, 1985. FIELDER e colaboradores (1989), por sua vez, observaram diminuição de BF S em familiares de pacientes com AR. Tais dados refletem a heterogeneidade genética dos grupos avaliados e o possível envolvimento das variantes de BF na susceptibilidade e/ou proteção à AR.

A participação de BF na susceptibilidade genética da AR e de outras doenças autoimunes foi demonstrada através da associação entre o alótipo BF SF e

presença de autoanticorpos em pacientes com AR (WARLOW *et al.*, 1988). Lanchbury, Pal e Papiha (1987) demonstraram aumento significativo do fenótipo BF SS e deficiência de BF SF entre pacientes positivos para o FR e negativos para o fator anti-nuclear (FAN). Os autores sugeriram novamente a heterogeneidade de BF entre subgrupos de pacientes com AR, classificados em relação à presença de autoanticorpos definidos, e também confirmaram a presença do fenótipo BF SS como um marcador de susceptibilidade e/ou gravidade da doença.

A associação negativa do fenótipo BF SF com as classes funcionais III e IV da AR, obtida em pacientes brasileiros com FR positivo, levou os autores a sugerir um papel deste fenótipo na evolução clínica da AR e na proteção ao desenvolvimento de formas clínicas mais incapacitantes (WATZKO; MESSIAS, 1994). Estudos com um número maior de pacientes e a inclusão de familiares nas análises certamente trarão esclarecimentos relevantes, em adição às associações com o anticorpo anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA.

Resultados conflitantes na literatura sugerem que a participação de BF na AR requer novas abordagens. Pesquisas envolvendo pacientes e familiares adequadamente selecionados quanto aos parâmetros clínicos, imunológicos e étnicos, certamente contribuirão ao esclarecimento do papel dos alótipos de BF na susceptibilidade à doença. Na população brasileira, são inexistentes investigações do polimorfismo de BF nos pacientes com AR e familiares concomitantemente. Também não se dispõe de relatos de associação entre a variabilidade alotípica de BF, dados clínicos e sorológicos (FR-IgM, FR-IgA, anti-CCP e anti-MCV) dos pacientes. Tais aspectos conferem um caráter inédito ao presente estudo e ressaltam a relevância e aplicabilidade do mesmo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA

O presente estudo constitui uma investigação de caráter imunológico, transversal e interinstitucional, realizado através de uma parceria entre a Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e o Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (ANEXO 1).

O projeto está inserido em uma linha de pesquisa em AR, desenvolvida no Laboratório de Imunopatologia Molecular (GOELDNER *et al.*, 2010a; GOELDNER *et al.*, 2010b; GOELDNER *et al.*, 2014b), e contou com o auxílio parcial da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

### 4.2 CASUÍSTICA

#### 4.2.1 Pacientes com Artrite Reumatoide

Fazem parte do estudo 210 pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba, cujas amostras de sangue foram coletadas entre agosto de 2007 e abril de 2009.

O referido Ambulatório possuía na época, aproximadamente 500 pacientes com AR registrados, sendo realizadas, em média, 20 a 30 consultas por semana. Por ocasião dessas consultas, os pacientes foram informados e esclarecidos sobre o projeto e convidados a participar do estudo, juntamente com seus familiares. Aqueles que concordaram em participar, após consentimento formal, tiveram sua amostra de sangue coletada.

Os pacientes com AR foram selecionados consecutivamente frente aos seguintes critérios de inclusão: o paciente deveria atender ao menos 4 critérios de diagnóstico estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ARNETT *et al.*, 1988), ser maior de 18 anos e a idade de início da doença deveria ser maior ou igual a 16 anos. Com relação aos critérios de exclusão, foram rejeitados para o estudo,



pacientes menores de 18 anos ou cuja idade de início da doença fosse inferior a 16 anos.

Dentre os 210 pacientes, 178 (84,8%) eram do gênero feminino e 32 (15,2%) do masculino. A caracterização das amostras dos pacientes foi determinada e devidamente registrada com base na análise de seu histórico clínico, o qual foi levantado através de consulta ao questionário epidemiológico utilizado pelo ambulatório e, eventualmente, através dos prontuários médicos dos pacientes. Foram levantados dados referentes à idade de início da doença (18 a 30 anos, >30-60 anos e acima de 60 anos), duração da doença (0 a 2 anos, >2 a 10 anos, > 10 anos), classe funcional (I, II, III e IV), tabagismo, presença de manifestações extra-articulares como nódulos reumatoides, síndrome de Sjögren e doença pulmonar.

#### 4.2.2 Familiares de Pacientes com Artrite Reumatoide

Participaram do estudo 198 familiares de pacientes com AR, cujo critério de inclusão principal foi ser familiar de 1º ou 2º grau de paciente com AR e concordar em ser incluído no estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido. Durante as consultas periódicas, os pacientes foram convidados a trazer seus familiares para participar da pesquisa. Foi realizado o agendamento das coletas e, após consentimento formal, os familiares tiveram seu sangue coletado. Os familiares participantes representam 78 famílias, totalizando uma proporção de 2,54 familiares por paciente. Destes, 61,1% (121/198) eram do gênero feminino e 38,9% (77/198) do gênero masculino, com idade variando entre 7 e 91 anos (média 36,8 anos). Em relação à etnia, 154 (77,8%) eram euro-descendentes e 44 (22,2%) afrodescendentes. Quanto ao grau de parentesco, 93,9% (186/198) eram familiares de primeiro grau e 6,1% (12/198) de segundo grau.

Através de um questionário aplicado no momento da coleta do sangue (ANEXO 2), foram levantadas informações a respeito do uso de álcool e tabaco, sintomas articulares, alterações gastrointestinais, anemia, problemas hepáticos, distúrbios da tireóide. Também foram registrados dados referentes a doenças anteriores e/ou atuais e medicamentos em uso.

#### 4.2.3 Grupo Controle

Como grupo controle, foram estudadas amostras de 98 indivíduos voluntários e sadios, que declararam não ter familiares com AR. As amostras de sangue desses indivíduos fazem parte da soroteca do Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas - UFPR. Tais amostras foram obtidas de profissionais e estudantes da área da saúde, os quais tiveram seu sangue coletado após esclarecimento e consentimento formal prévio. Esses eram oriundos da mesma área geográfica dos pacientes com AR e seus familiares, e apresentavam a maior proximidade possível em relação aos dados demográficos dos pacientes. A idade dos indivíduos variou de 23 a 81 anos (média 47,2 anos), sendo 82,6% (81/98) do gênero feminino e 17,4% (17/98) do gênero masculino.

### 4.3 MÉTODOS

#### 4.3.1 Obtenção das Amostras

Após prévio esclarecimento e consentimento dos indivíduos incluídos nos grupos em estudo, aproximadamente 15 mL de sangue venoso foi coletado e dividido em dois tubos (sem anticoagulante e com EDTA). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 3.500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburg, Alemanha). Em seguida, as amostras sem anticoagulante foram subdivididas em 3 alíquotas de soro, as quais foram armazenadas à temperatura de -80°C, até serem utilizadas nas determinações laboratoriais. As amostras com EDTA foram subdivididas em plasma e *buffycoat* (camada de leucócitos), e foram também armazenadas à temperatura de -80°C. A coleta de sangue foi realizada no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba e as determinações laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.3.2 Tipagem do Fator B

As variantes alotípicas de BF foram detectadas através de eletroforese em gel de agarose, sob alta voltagem, seguida de imunofixação com anticorpos anti-BF humano, de acordo com ALPER *et al.* (1972).

A eletroforese consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo), sendo que a carga líquida das moléculas é função somatória dos aminoácidos que as constituem. Em razão das proteínas serem substâncias anfóteras, é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, pelo uso da solução tampão (HAMES, 1981; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Para que essa técnica funcione, a mesma deve ser desenvolvida sob voltagem, corrente elétrica e potência constantes, além disso, a temperatura também é um fator a ser considerado. Cada molécula possui sua própria carga e seu próprio tamanho, portanto, ela se deslocará sempre numa determinada distância num campo elétrico num dado espaço de tempo. Portanto, espera-se que cada molécula se concentre numa estreita banda do gel (HAMES, 1981; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As amostras de soros foram aplicadas em placas de vidro contendo gel com 0,8% de agarose (Seakem ME, Marine Colloids, USA), em tampão barbital pH 8.7 (0,0008M de lactato de cálcio; 0,023M de barbital sódico; 0,0037M de ácido barbitúrico), e foram submetidas à eletroforese de alta voltagem (400V, 100mA, 40W), durante duas horas e trinta minutos, sob refrigeração constante a 8°C.

Para o preparo das placas (25 cm x 11 cm), foram aplicados 50 mL de agarose 0,8% (em ebulição) sobre a placa pré-aquecida, fixando de imediato o pente de perfuração. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, a placa foi colocada na geladeira (4 - 8°C), por 30 minutos, para completa polimerização do gel. Em seguida, o pente foi retirado e foram aplicados 3µL de soro teste, de cada indivíduo, nos orifícios do gel. Em cada placa também foi aplicado, nas extremidades, uma amostra de soro fresco para controle.

Simultaneamente, o aparelho para eletroforese (LKB-Pharmacia, Sweden) foi preparado, completando-se as duas cubas laterais com a solução de tampão barbital pH 8.7. A placa de vidro foi adaptada entre as cubas e o papel de filtro Whatmann nº 3 (duplo) foi colocado como ponte entre o gel e o tampão (FIGURA 10).

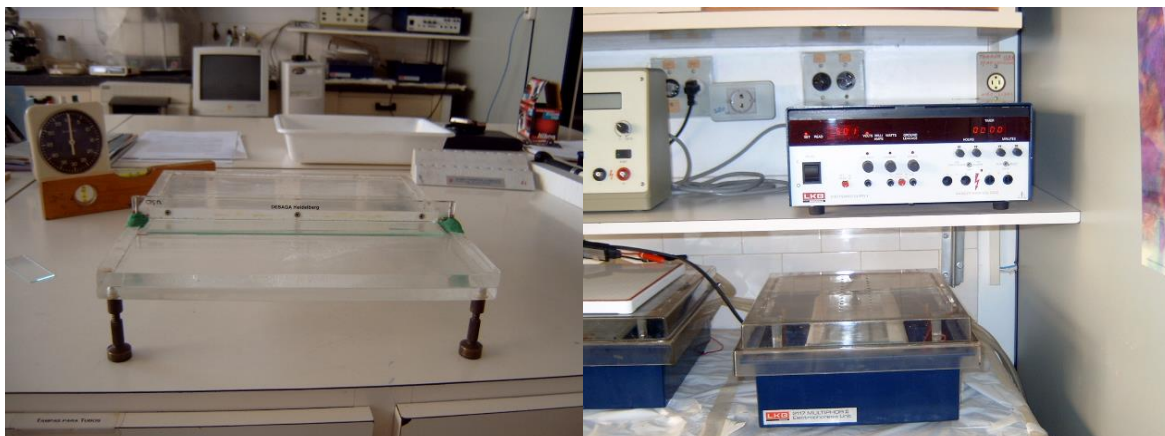


FIGURA 10 - PLACA DE VIDRO PRÉ AQUECIDA E CUBA DE ELETROFORESE COM TAMPÃO  
FONTE: O autor (2013).

Após a eletroforese, foi aplicado sobre o gel o anticorpo anti-BF (AtlanticAntibodies, USA) diluído 1:2 (200µl de anti-BF e 200µl de solução salina 0,9%), com o auxílio de um bastão de vidro. A imunofixação foi realizada com o anticorpo durante 90 minutos, à temperatura ambiente, e em câmara úmida. A seguir, a placa foi lavada com solução salina 0,9% durante 18 horas, e então pressionada com 2 quilos de peso, sob várias folhas de papel filtro úmidas, por 5 minutos. Após secar em estufa a 37°C, a placa foi corada com solução corante a 0,5% (ComassieBrilliantBlue R-250, Sigma, USA), durante 20 minutos, e posteriormente descorada com solução descorante (450 mL de etanol a 96%; 100 mL de ácido acético e 450 mL de H<sub>2</sub>O destilada) por, aproximadamente, 10 minutos. Após lavar novamente a placa em água corrente e secar em estufa, foi realizada a leitura das variantes de BF.

A leitura foi efetuada pela visualização das bandas na região superior à aplicação dos soros na placa, comparando a localização das mesmas com a de soros padrões, de fenótipos conhecidos, conforme descrito na literatura (GESERICK, 1990) (FIGURA 11).

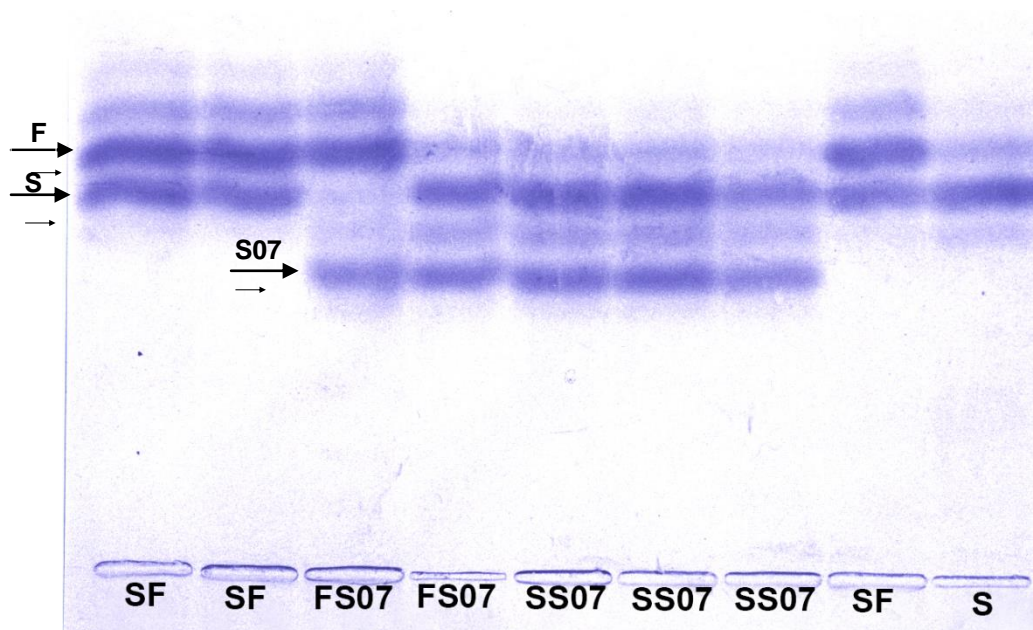


FIGURA 11 - VARIANTES ALOTÍPICAS DE BF DETECTADAS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM  
 NOTAS: S, SF, FS07, SS07: Variantes alotípicas de BF  
 FONTE: O autor (2013).

#### 4.3.3 Determinação do Fator Reumatoide IgA (FR-IgA)

O FR-IgA foi investigado nos soros de pacientes, familiares e indivíduos do grupo controle, por ELISA, utilizando kits comerciais (INOVA, USA). Este teste utiliza micropoços revestidos com IgG de coelho como fase sólida da reação.

Todas as amostras foram diluídas na proporção de 1:101, em diluente de amostras HRP (solução tampão salina Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservante), utilizando 5µL de amostra em 500µL de diluente. Pipetou-se nos poços da microplaca sensibilizada 100µl das amostras diluídas, e 100µL de cada um dos calibradores (A - E) e dos controles FR-IgA ELISA, ambos pré-diluídos. Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente (20°C-28°C), fez-se 3 lavagens com 200-300µL de solução de lavagem HRP (tampão salina Tris e Tween 20) diluída (1:40) em água destilada para a remoção dos anticorpos que não se ligaram.

Pipetou-se em cada poço 100µL do conjugado enzimático HRP IgA (IgA anti-humana de cabra), possibilitando a ligação desse a qualquer anticorpo FR-IgA das amostras que tenham ficado aderidos aos micropoços. Após incubação de 30

minutos à temperatura ambiente, fez-se novamente 3 lavagens como na etapa anterior. Adicionou-se 100µL do cromógeno TMB a cada poço e fez-se nova incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro.

Adicionou-se 100µL de solução de parada HRP (ácido sulfúrico 0,344M) a cada poço. A reação enzimática gerou um produto colorido cuja intensidade de cor foi aferida à 450nm em leitor de ELISA (OrganonTeknika Reader 530 version 1,24) dentro do prazo de 1 hora após a parada da reação (FIGURA 12).



FIGURA 12– LEITOR DE ELISA  
FONTE: O autor (2012).

#### 4.3.3.1 Validação do ensaio

Para que os resultados dos testes de ELISA para FR-IgA possam ser considerados válidos, devem ser cumpridos todos os critérios a seguir. Caso algum desses não for cumprido, deve-se considerar o teste inválido e o ensaio deverá ser repetido.

- a- A absorbância do Calibrador A deve ser superior à absorbância do Controle FR-IgA positivo que, por sua vez, deve ser superior à absorbância do Controle FR-IgA negativo;
- b- O Calibrador A deve ter uma absorbância superior a 1,0, enquanto o Controle FR-IgA negativo não pode ter absorbância superior a 0,2;
- c- A absorbância do Controle FR-IgA positivo deve ser mais do que o dobro da absorbância do Controle FR-IgA negativo, ou superior a 0,25;
- d- A concentração dos controles FR-IgA deve se encontrar dentro dos limites definidos no seu rótulo;

#### 4.3.3.2 Cálculo e interpretação dos resultados

Para cálculo dos resultados utilizou-se uma linha de curva de regressão linear, escala log/log, na qual os valores das absorbâncias das amostras foram colocados na curva padrão contra os seus valores em unidades. As concentrações do FR-IgA desconhecidas das amostras foram determinadas no eixo “X”, por leitura da absorbância correspondente no eixo “Y”.

As amostras foram classificadas de acordo com os seguintes valores:

Negativa  $\leq 6$  unidades

Positiva  $> 6$  unidades

#### 4.3.4 Determinação do Anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV)

Os anticorpos anti-MCV foram pesquisados em todas as amostras de soros de pacientes, familiares e indivíduos do grupo controle, por ELISA, utilizando kits comerciais (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany).

Este teste utiliza microplaca constituída por poços revestidos com MCV humana altamente purificada, como fase sólida da reação.

Todas as amostras foram diluídas na proporção 1:100, em tampão de diluição (solução tampão salina Tris,  $\text{NaN}_3 < 0,1\%$  amarelo), utilizando 10  $\mu\text{L}$  de soro em 990  $\mu\text{L}$  de tampão. Em seguida, pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  de calibradores, soros controles, ambos prontos para uso, e amostras pré-diluídas nos poços sensibilizados com MCV. Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ - $28^\circ\text{C}$ ), fez-se 3 lavagens com 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem específico (PBS e  $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) para a remoção dos anticorpos que não se ligaram.

Pipetou-se em cada poço 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário conjugado (anticorpo anti-IgG humano policlonal marcado com peroxidase em matriz PBS/BSA) a fim de que esses se liguem ao anticorpo primário, formando um complexo. A reação ocorre em 15 minutos à temperatura ambiente.

O excesso de anticorpo secundário que não se ligou foi removido por 3 lavagens com tampão de lavagem e, em seguida foram adicionados, a cada poço, 100  $\mu\text{L}$  do cromógeno tetrametilbenzidina, fornecedor de hidrogênio para a reação do

substrato peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) com a peroxidase. Após nova incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro, adicionou-se a solução de parada (stop solution) em cada escavação e foi mantido repouso da placa durante 5 minutos.

A reação enzimática gerou um produto colorido cuja intensidade de cor foi aferida à 450nm em leitor de ELISA.

Os resultados dos testes para o anticorpo anti-MCV foram calculados através de uma curva de 4 parâmetros-Fit de coordenadas lin-log para as densidades ópticas e concentrações.

#### 4.3.4.1 Validação do ensaio

Para que os resultados da pesquisa do anti-MCV (kit ORGENTEC ) possam ser considerados válidos, devem ser cumpridos os critérios definidos pelo fornecedor.

A densidade óptica (DO), à 450nm, para o controle positivo e controle negativo, como também para os calibradores “A” e “F”, deve estar de acordo com os valores respectivos indicados no certificado de controle de qualidade que se encontra em cada kit.

Caso algum destes valores não coincidir, os resultados deverão ser considerados inválidos e o teste deverá ser repetido.

#### 4.3.4.2 Cálculo e interpretação dos resultados

Para cálculo dos resultados de anti-MCV IgG utilizou-se uma curva de 4 parâmetros de coordenadas lin-log para as DO e concentração. Registrou-se em papel logarítmico a DO vs concentração de cada calibrador, sendo traçada a melhor curva para os pontos de calibração obtidos. Dessa forma, a concentração das amostras desconhecidas foi estimada a partir da curva de calibração por interpolação.

As amostras foram classificadas de acordo com os seguintes valores:

Negativa <60 U/mL

Positiva ≥60U/mL



#### 4.3.5 Determinação do Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP)

Os anticorpos anti-CCP foram investigados previamente nos soros dos familiares, controles e 156 pacientes com AR (SILVA, 2009, GOELDNER *et al.*, 2010a), sendo realizada a pesquisa deste biomarcador em mais 54 pacientes, totalizando 210 indivíduos testados no presente estudo.

A pesquisa foi realizada pelo método de ELISA, utilizando kits comerciais (Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA).

O princípio do método consiste na ligação dos anticorpos anti-CCP, presentes nas amostras dos indivíduos, aos antígenos específicos imobilizados na superfície da microplaca. As amostras que não se ligaram, pela ausência do anticorpo, foram removidas através de lavagens da placa com tampão de lavagem. Um conjugado enzimático anti-IgG humano foi adicionado à reação em cada poço, permitindo a ligação do mesmo ao anticorpo do paciente. Após nova lavagem, a atividade enzimática remanescente foi mensurada pela adição de um substrato cromogênico. A reação enzimática gerou um produto colorido cuja intensidade de cor foi aferida em leitor de ELISA (OrganonTeknika Reader 530 version 1,24), a 450nm (FIGURA 11).

O cálculo da concentração de anti-CCP foi realizado por comparação da cor desenvolvida nas amostras, em relação à cor obtida nos controles, conforme orientação do fornecedor. Os resultados das amostras foram classificados como negativo, positivo fraco, moderado ou forte, de acordo com os dados sugeridos pelo fornecedor, conforme especificado na TABELA 2.

TABELA 2 RESULTADO DAS AMOSTRAS DE SOROS PARA O ANTI-CCP DE ACORDO COM AS UNIDADES OBTIDAS

RESULTADO	UNIDADES
Negativa	<20
Fracamente positiva	20 – 39
Moderadamente positiva	40 – 59
Fortemente positiva	≥ 60

FONTE: InovaDiagnostics Inc., (San Diego, USA)

#### 4.3.6 Determinação do Fator Reumatoide IgM (FR-IgM)

O FR-IgM foi dosado em estudos prévios nas amostras de familiares, grupo controle e 156 pacientes (GOELDNER *et al.*, 2010a). Para completar a pesquisa no total dos 210 pacientes em estudo foi realizada a determinação e titulação desse autoanticorpo no soro de mais 54 pacientes com AR.

O FR-IgM foi investigado através da técnica de aglutinação em látex, de acordo com PLOTZ e SINGER (1956), utilizando kits comerciais (BioSystems, S.A., Barcelona, Espanha).

A determinação se baseia na reação entre o FR presente nos soros testes e as partículas de látex de poliestireno sensibilizadas por IgG humana. São consideradas positivas as amostras com nítida aglutinação, sendo essas, então, diluídas em cloreto de sódio 0,9% e re-testadas para definição do título final da reação. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada bateria de reação (FIGURA 13).

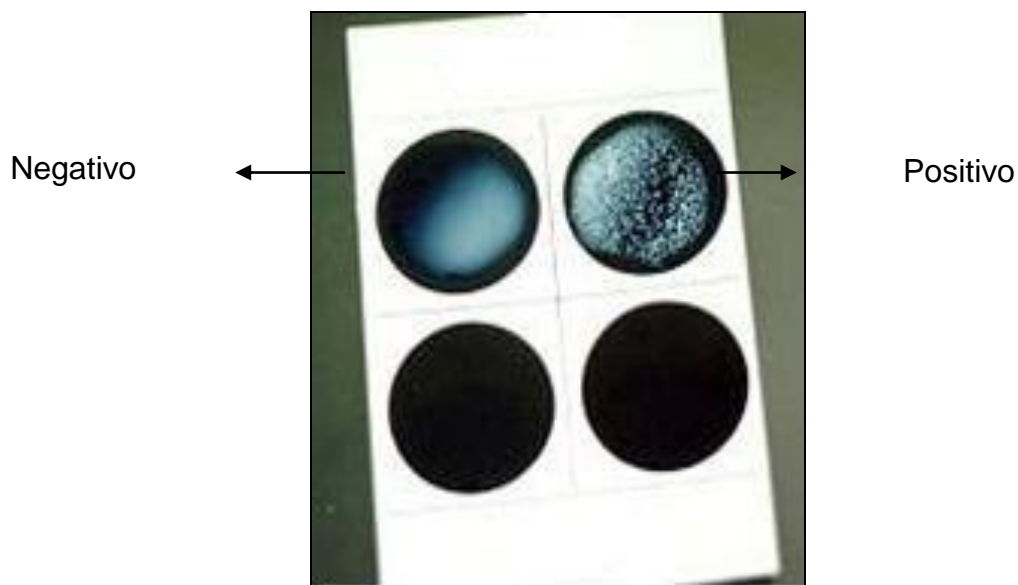


FIGURA 13 – AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA A DETERMINAÇÃO DO FR  
FONTE: O Autor (2012).

#### 4.3.7 Correlação Clínico-laboratorial

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes e familiares foram avaliados e compilados em planilhas do Excell através da leitura dos prontuários médicos e questionários, aplicados no momento da coleta de sangue. Esses dados foram submetidos a uma análise, visando a associação com os dados laboratoriais obtidos nas determinações séricas das variantes alotípicas de BF, assim como de FR-IgA, anti-MCV, anti-CCP e FR-IgM.

#### 4.3.8 Análise Estatística

Os resultados das concentrações séricas do anti-MCV, anti-CCP, FR-IgA e FR-IgM foram gradualmente organizados em tabelas e gráficos e associados aos dados clínicos e demográficos dos pacientes e familiares, para que através da análise estatística fosse possível fazer a correlação clínico-laboratorial dos dados.

As frequências fenotípicas de BF foram determinadas através de contagem direta. O número de indivíduos portadores dos alótipos, detectados em cada grupo em estudo, também foi obtido por contagem direta, a partir de frequências fenotípicas, e convencionou-se denominar tal agrupamento como “distribuição dos alótipos”. As frequências alotípicas foram calculadas contando-se quantas vezes um determinado alótipo esteve presente em uma determinada amostra e então este número foi dividido pelo número total de alótipos existentes na mesma amostra.

A análise das frequências alotípicas nos grupos comparados foi elaborada através de uma tabela de contingência 2 x 2, aplicando-se o teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

A hipótese de equilíbrio de Hardy Weinberg, segundo Guo e Thompson (2002), foi testada utilizando o programa ARLEQUIN V.3.5 (EXCOFFIER, 2010). Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes do qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal, conforme o que for mais adequado. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Para as análises de

regressão logística binária, foi utilizado o programa STATA 9.2 (STATA Corp, Texas, EUA).

As comparações entre médias ou medianas foram feitas através dos testes ANOVA, teste T, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, dependendo se há, ou não, normalidade na distribuição dos dados. Valores de p menores que 0.05 foram considerados significativos. Para as análises de correlação foi empregado o teste de Spearman. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foram utilizados os programas Microsoft-Statistic 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e GraphPadPrism 4.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA).

## 5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa dos anticorpos anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM, FR-IgA e a classe funcional dos pacientes, assim como a distribuição dos fenótipos de BF observada nos pacientes com AR encontram-se no APÊNDICE 1. Os dados referentes aos familiares e controles estão demonstrados nos APÊNDICES 3 e 4, respectivamente.

Em relação às características demográficas, os pacientes apresentaram idade variando de 18 a 84 anos (média 50,9 anos) no momento da coleta do sangue. Quanto à etnia, 72,8% (131/180) eram eurodescendentes, 26,7% (48/180) afrodescendentes e 0,6% (1/180) ameríndio.

Dados referentes à idade de início da doença, duração da doença, classe funcional, tabagismo e presença de manifestações extra-articulares encontram-se descritos na TABELA 3.

TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR

Característica clínica	Pacientes N(%)	
Idade de início da doença (209)*		
18 a 30 anos	51	(24,4)
>30 a 60 anos	144	(68,9)
>60 anos	14	(6,7)
Tempo de duração da doença (209)*		
6 a 24 meses	45	(21,5)
>2 a 10 anos	98	(46,9)
>10 anos	66	(31,6)
Tabagismo (189)*	87	(46)
Classe funcional (209)*		
I	99	(47,4)
II	83	(39,7)
III e IV	27	(12,9)
Manifestações extra-articulares (198)*		
Nódulos reumatoides	17	(8,6)
Síndrome de Sjögren	49	(24,7)
Fibrose Pulmonar	15	(7,6)

NOTA: \*= N total de pacientes com informação disponível

As MEA avaliadas nessa pesquisa (nódulos reumatoides, fibrose pulmonar e Síndrome de Sjögren) correspondem àquelas que se apresentaram com maior frequência entre os pacientes em estudo. O diagnóstico de fibrose pulmonar foi feito através de tomografia computadorizada, enquanto o de Sjögren secundário foi realizado de acordo com os critérios europeus modificados no Consenso Americano-Europeu em 2002 (VITALI *et al.*, 2002).

### 5.1 ANTICORPOS ANTI-CCP, ANTI-MCV, FR-IgM E FR-IgA EM PACIENTES COM AR, FAMILIARES E CONTROLES

A positividade total de anticorpos anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA nas amostras foi significativamente elevada entre os pacientes (86,7%; 182/210) em relação aos familiares (26,3%; 52/198;  $p<0,0001$ ) e controles (17,4%; 16/92;  $p<0,0001$ ). Não houve diferença na taxa de positividade entre familiares e o grupo controle (GRÁFICO 1).

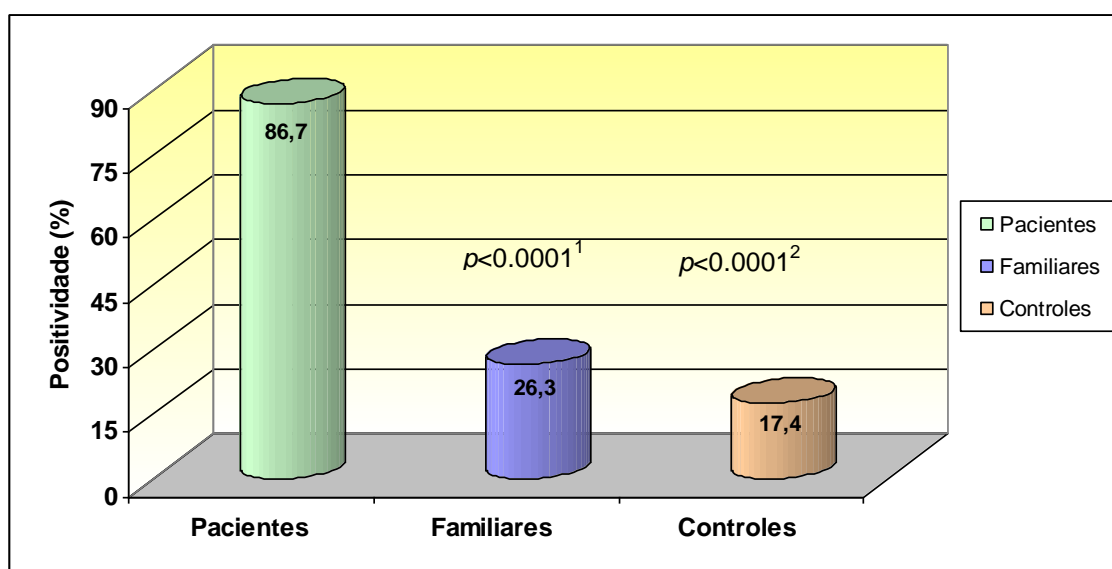


GRÁFICO 1 – POSITIVIDADE TOTAL DOS AUTOANTICORPOS NOS GRUPOS EM ESTUDO

LEGENDA: <sup>1</sup> Positividade Total Pacientes vs. Familiares:  $p<0,0001$

<sup>2</sup> Positividade Total Pacientes vs. Grupo controle:  $p<0,0001$

NOTA: Teste exato de Fisher

Dentre os 210 pacientes com AR, 75,7% (159/210) apresentaram positividade para anti-CCP, 68,1% (143/210) para o anti-MCV, 69% (145/210) para o FR-IgM e 65,7% (138/210) para o FR-IgA. A taxa de positividade encontrada nos pacientes foi

significativamente maior que a do grupo controle. Dentre estes, 1,1% (1/92) foram positivos para o anti-CCP, 6,5% (6/92) para FR-IgM, 7,6% (7/92) para o anti-MCV e 5,4% (5/92) para o FR-IgA ( $p<0.0001$  para todas as comparações). No grupo dos familiares, observou-se diferença significativa na taxa de positividade do FR-IgA (14,6%, 29/198) em relação à dos controles (5,4%, 5/92,  $p=0,030$ ;  $OR=2,98$ ;  $IC=1,11-7,98$ ). Para o anti-CCP (5,6%; 11/198), FR-IgM (8,1%, 16/198) e anti-MCV (8,1%; 16/198) não foram observadas diferenças significantivas entre estes grupos. As comparações entre as freqüências de anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA em pacientes e familiares, também evidenciaram diferenças significantivas ( $p<0.0001$ ). O GRÁFICO 2 permite verificar a positividade para os 4 biomarcadores nas amostras de pacientes com AR, familiares e controles, bem como as análises entre os grupos.

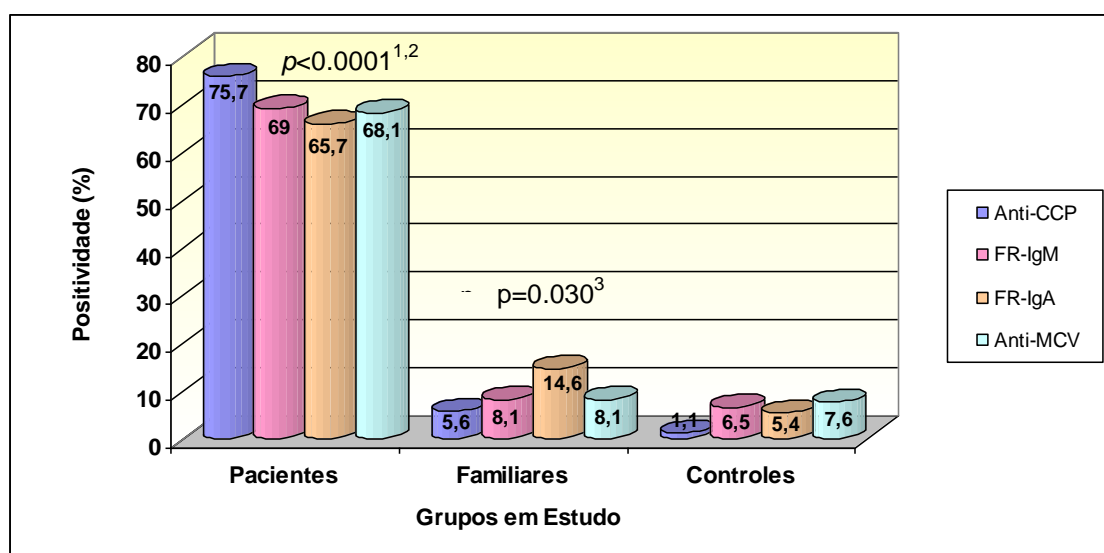


GRÁFICO 2 – POSITIVIDADE INDIVIDUAL DOS BIOMARCADORES NOS GRUPOS EM ESTUDO  
 LEGENDA: <sup>1</sup> Pacientes anti-CCP+; anti-MCV+; FR-IgM+ e FR-IgA+ vs. respectivo grupo controle:  $p<0.0001$

<sup>2</sup> Pacientes anti-CCP+; anti-MCV+; FR-IgM+ e FR-IgA+ vs respectivos familiares :  $p<0.0001$

<sup>3</sup> Familiares FR-IgA+ vs. Grupo controle FR-IgA+:  $p=0,030$ ;  $OR=2,98$ ;  $IC = 1,11-7,98$

NOTA: Teste exato de Fisher

Ao comparar a positividade dos biomarcadores dentro do mesmo grupo foi possível observar que a frequência de pacientes com AR positivos para o anti-CCP foi significativamente superior à de pacientes positivos para o FR-IgA ( $p=0,0318$ ). Nesse contexto, familiares FR-IgA positivos tenderam à significância na positividade comparados aos familiares positivos para o FR-IgM e anti-MCV ( $p=0,0565$  para

ambos) e apresentaram diferença significativa em relação ao anti-CCP ( $p=0,0041$ ) (GRÁFICO 3).

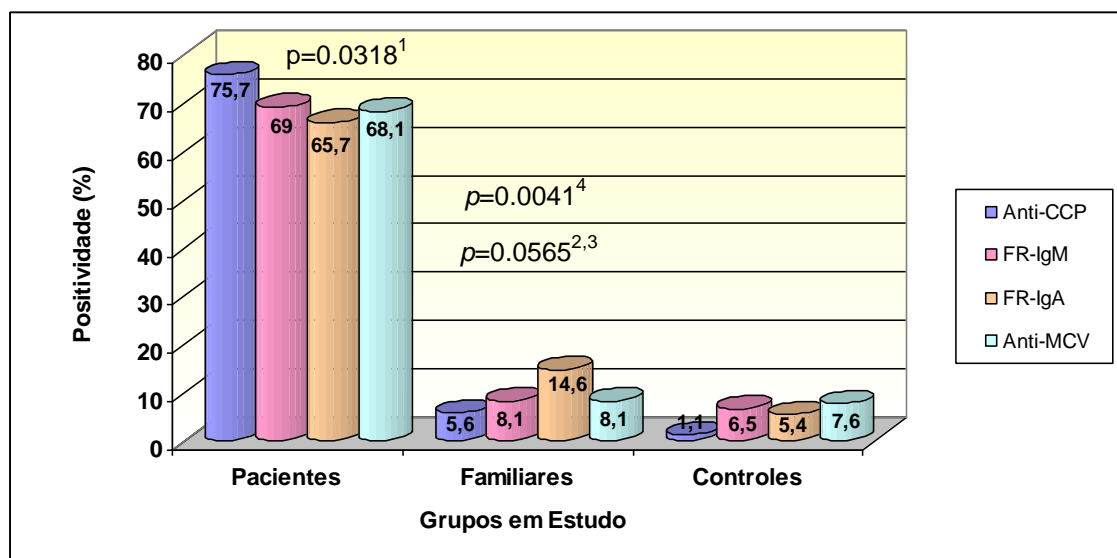


GRÁFICO 3 – POSITIVIDADE DOS BIOMARCADORES DENTRE OS GRUPOS EM ESTUDO

LEGENDA: <sup>1</sup> Pacientes anti-CCP+ vs. Pacientes FR-IgA+:  $p=0.0318$

<sup>2</sup> Familiares FR-IgA+ vs. Familiares FR-IgM+:  $p=0,0565$

<sup>3</sup> Familiares FR-IgA+ vs. Familiares anti-MCV+:  $p=0,0565$

<sup>4</sup> Familiares FR-IgA+ vs. Familiares anti-CCP+:  $p=0,0041$

NOTA: Teste exato de Fisher

#### 5.1.1 Positividade dos biomarcadores em pacientes com AR, familiares e controles em relação aos títulos de anticorpos

A distribuição dos anticorpos anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA, bem como as diferenças nas concentrações de cada biomarcador nos indivíduos em estudo podem ser observadas no GRÁFICO 4.

A concentração do anti-CCP apresentou variação de 21 a 254 U/mL (mediana 160 U/mL) nos pacientes positivos, e de 20 a 234 U/mL (mediana 121 U/mL) nos familiares. No grupo controle, a única amostra positiva caracterizou 24 U/mL. A comparação entre pacientes e familiares positivos para o anti-CCP não apresentou diferença estatística ( $p=ns$ ; GRÁFICO 4A).

Para o anti-MCV, as concentrações nos pacientes variaram de 61 a 2921 U/mL (mediana 596 U/mL); nos familiares de 60 a 1156 U/mL (mediana 122 U/mL); e nos controles de 67 a 1013 U/mL (mediana 82 U/mL). Pacientes positivos para o anti-MCV apresentaram títulos significativamente mais elevados que



familiares ou indivíduos do grupo controle positivos ( $p=0,0003$  e  $p=0,0126$ , respectivamente; GRÁFICO 4B).

A positividade para o FR-IgM foi de 30 a 7680 UI/mL (mediana 240 UI/mL) nos pacientes, de 30 a 1280 UI/mL (mediana 30 UI/mL) nos familiares e de 60 a 120 UI/mL (mediana 60 UI/mL) nos controles. Os títulos desse anticorpo foram mais elevados entre os pacientes quando comparados aos familiares e controles ( $p<0,0001$  e  $p=0,0204$ , respectivamente), assim como nos familiares em relação aos controles ( $p=0,0098$ , GRÁFICO 4C).

O FR-IgA variou de 7 a 198 UI/mL (mediana 45 UI/mL) em pacientes, de 7 a 155 UI/mL (mediana 11 UI/mL) em familiares e de 10 a 125 UI/mL (mediana 21 UI/mL) nos controles, com diferença significativa nos títulos apenas quando comparados pacientes e familiares ( $p<0,0001$ , GRÁFICO 4D).

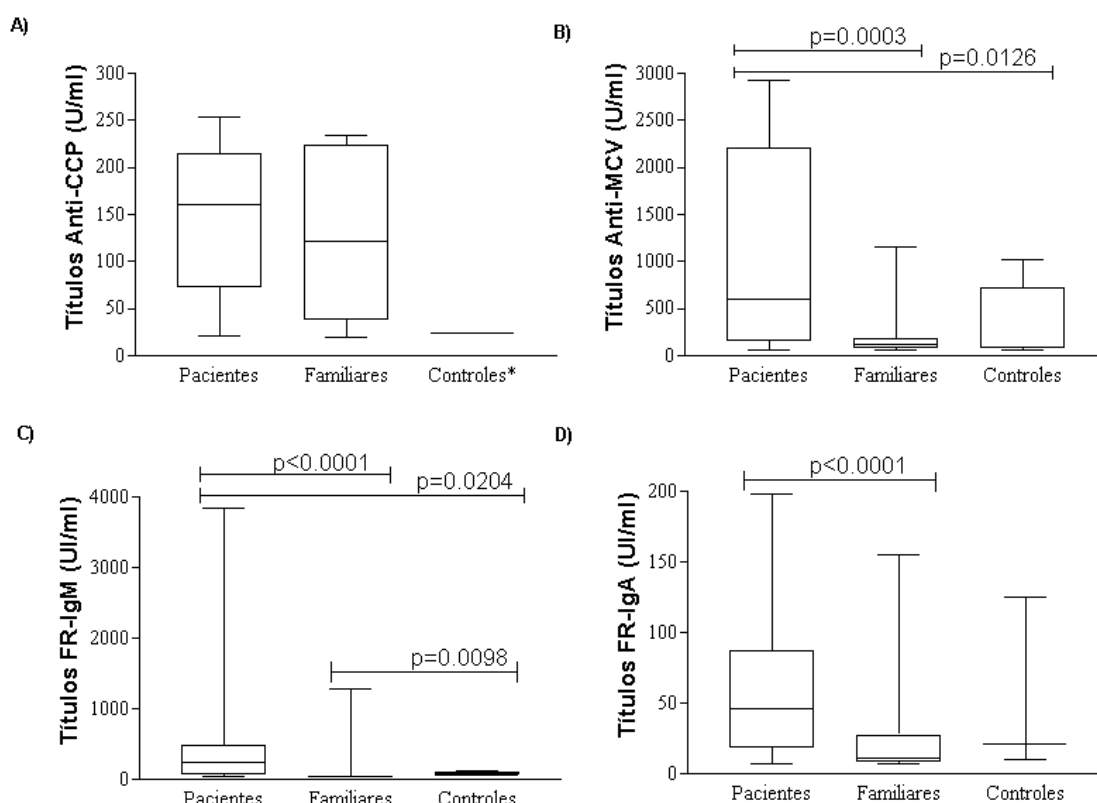


GRÁFICO 4 – TÍTULOS DE (A) ANTI-CCP, (B) ANTI-MCV, (C) FR-IgM E (D) FR-IgA EM PACIENTES, FAMILIARES E CONTROLES

LEGENDA: \*A ocorrência de apenas um indivíduo positivo para o anti-CCP nos controles não permitiu a análise com pacientes e familiares

NOTA: Todas as comparações foram feitas com o teste Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal

A TABELA 4 mostra que existe correlação significativa entre os títulos de anticorpos para os 4 biomarcadores nos pacientes com AR ( $p < 0,0001$ , teste de Spearman), sendo observada maior correlação entre os anticorpos anti-CCP e anti-MCV ( $r = 0,73$ ), assim como entre o FR-IgM/FR-IgA ( $r = 0,71$ ).

TABELA 4 – CORRELAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES NOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

	<b>MCV/ FR-IgM</b>	<b>MCV/ FR-IgA</b>	<b>MCV/ CCP</b>	<b>FR-IgM/ FR-IgA</b>	<b>FR-IgM/ CCP</b>	<b>FR-IgA/ CCP</b>
Spearman R	0,38	0,41	<b>0,73</b>	<b>0,71</b>	0,46	0,47
95% I.C.	0,25-0,49	0,28-0,52	0,65-0,78	0,64-0,78	0,34-0,56	0,35-0,57
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

LEGENDA: MCV: anticorpo anti-vimentina citrulina mutado;  
CCP: anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado  
FR-IgM: fator reumatoide da classe IgM  
FR-IgA: fator reumatoide da classe IgA

NOTA: Teste de Spearman

A pesquisa dos quatro biomarcadores em amostras de pacientes com AR demonstrou que os anticorpos anti-CCP apresentam a maior especificidade e sensibilidade diagnóstica (0,99 e 0,76, respectivamente) quando comparado ao FR-IgM, FR-IgA e ao anti-MCV, sendo ainda o teste de maior valor preditivo positivo (0,99; TABELA 5).

TABELA 5 – ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

<b>Teste</b>	<b>Sensibilidade (95% IC)</b>	<b>Especificidade (95% IC)</b>	<b>Valor Preditivo Positivo</b>	<b>Valor Preditivo Negativo</b>
Anti-CCP	0,76 (159/210)	0,99 (91/92)	0,99 (159/160)	0,64 (91/142)
FR-IgM	0,69 (145/210)	0,94 (86/92)	0,96 (145/151)	0,57 (86/151)
FR-IgA	0,66 (138/210)	0,95 (87/92)	0,96 (138/143)	0,55 (87/159)
Anti-MCV	0,68 (143/210)	0,92 (85/92)	0,95 (143/150)	0,56 (85/152)

LEGENDA: MCV: anticorpo anti-vimentina citrulina mutado;  
CCP: anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado  
FR-IgM: fator reumatoide da classe IgM  
FR-IgA: fator reumatoide da classe IgA

A sensibilidade do anti-CCP foi significativamente maior que a do FR-IgA ( $p=0,0318$ ), porém, não foi significativamente diferente da do anti-MCV e ao FR-IgM. Por sua vez, a especificidade do anti-CCP não diferiu estatisticamente das especificidades do FR-IgM e FR-IgA.

#### 5.1.2 Análise da concomitância dos biomarcadores nos grupos em estudo

Em 79,5% (167/210) dos pacientes foi encontrado mais de um marcador positivo. Do total de 210 pacientes analisados, 46,2% (97/210) apresentaram positividade concomitante para os quatro biomarcadores, 20% (42/210) para três, 13,3% (28/210) para dois e 7,1% (15/210) foram positivos para apenas um deles. Vinte e oito pacientes (13,3%) foram negativos para todos os marcadores.

Entre os familiares, verificou-se que 2% (4/198) apresentaram positividade concomitante para os 4 anticorpos, 4% (8/198) para dois e 20,2% (40/198) para um, sendo que 73,7% (146/198) foram negativos para todos os marcadores. No grupo controle, 3,3% (3/92) dos indivíduos foram positivos para dois marcadores simultaneamente, 13 (14,1%) indivíduos foram positivos apenas para um anticorpo e o restante (82,6%; 76/92), negativos para todos os anticorpos. As comparações entre os grupos está representada no GRÁFICO 5.

#### 5.1.3 Concomitância dos biomarcadores em pacientes com AR e familiares

Entre os pacientes com AR positivos para 3 biomarcadores simultaneamente, a frequência da combinação anti-MCV/FR-IgA/FR-IgM foi significativamente menor que a das demais (7,1%;  $p\leq 0,01$ ), com predomínio da combinação anti-CCP/FR-IgA/FR-IgM, em 35,7% desses indivíduos. Por sua vez, em pacientes positivos para dois biomarcadores, a combinação anti-CCP/anti-MCV (42,9%) foi mais frequente em comparação às anti-CCP/FR-IgA (3,6%;  $p=0,0009$ ) e anti-MCV/FR-IgA (7,1%;  $p=0,0043$ ). Já a frequência da combinação anti-CCP/FR-IgM (25%) apresentou uma tendência a ser maior que a da anti-CCP/FR-IgA (3,6%;  $p=0,0511$ ).

Não houve diferença estatística significativa entre as frequências de biomarcadores positivos em pacientes positivos apenas para um anticorpo, nem

entre as freqüências de combinações de dois biomarcadores concomitantes nos familiares.

Dentre os 40 familiares com apenas um biomarcador, o FR-IgA foi o mais comum, sendo sua positividade (50%; 20/40) significativamente elevada em relação à do anti-CCP (12,5%,  $p=0,0006$ ), anti-MCV (17,5%;  $p=0,0041$ ) e FR-IgM (20%;  $p=0,0093$ ).

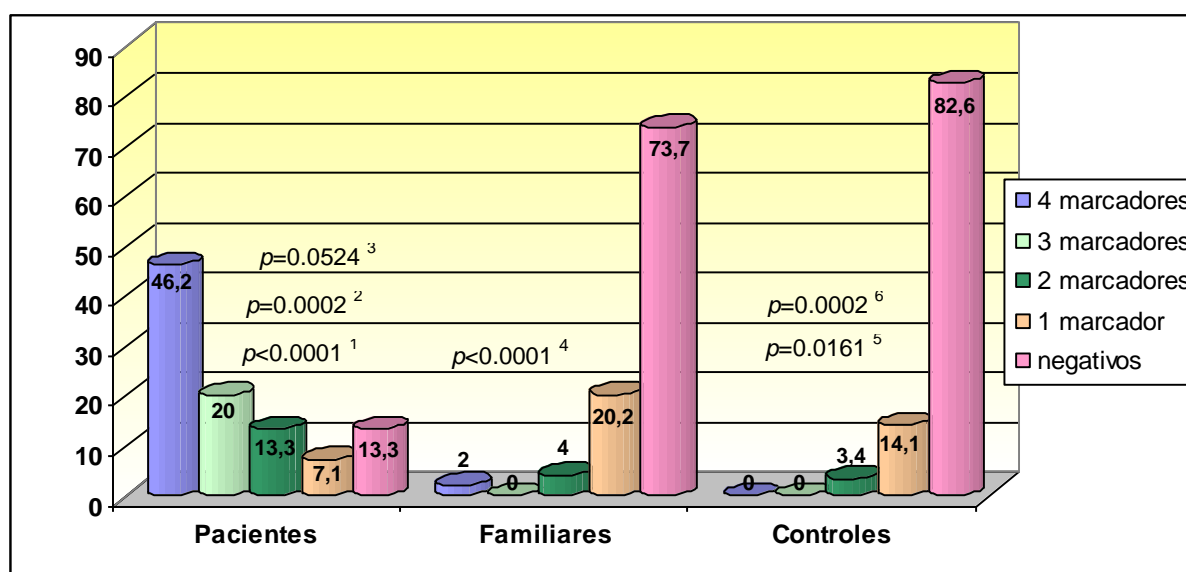


GRÁFICO 5 – NÚMERO DE BIOMARCADORES POSITIVOS SIMULTANEAMENTE NOS GRUPOS EM ESTUDO

LEGENDA: <sup>1</sup> Pacientes: 4 marcadores vs. 3, 2, 1 marcadores;  $p<0,0001$

<sup>2</sup> Pacientes: 3 marcadores vs. 1 marcador;  $p=0,0002$

<sup>3</sup> Pacientes: 2 marcadores vs. 1 marcador;  $p=0,0524$

<sup>4</sup> Familiares: 1 marcador vs. 4, 3, 2 marcadores;  $p<0,0001$

<sup>5</sup> Controles: 1 marcador vs. 2 marcadores;  $p=0,0161$

<sup>6</sup> Controles: 1 marcador vs. 4, 3 marcadores;  $p=0,0002$

NOTA: Teste exato de Fisher

#### 5.1.4 Análise dos biomarcadores em relação aos dados demográficos e clínicos dos pacientes com AR

A TABELA 6 apresenta os dados demográficos e clínicos dos pacientes com AR e sua associação a concomitância de biomarcadores (4 biomarcadores, 3 biomarcadores, 2 biomarcadores, 1 biomarcador ou nenhum biomarcador).

Houve uma diferença significativa na freqüência de pacientes do gênero feminino ( $p=0,0006$ ), numa proporção de 5,6 mulheres:1 homem. Contudo, as freqüências de homens com 4 biomarcadores e com 1 biomarcador foi maior que as

das mulheres (65,6% vs 42,7%,  $p=0,0206$ ; e 18,8% e 5,1%,  $p=0,0144$ ; respectivamente). Por outro lado, as mulheres com 3 biomarcadores foram mais freqüentes que os homens (23,6% vs 0%,  $p=0,0006$ ; TABELA 7).

Analisando-se os pacientes em relação ao número de biomarcadores não houve diferença estatística significativa em relação à média de idade dos indivíduos e às medianas da idade de início da doença e de duração da doença (TABELA 6). No entanto, quando a presença de biomarcadores concomitantes foi avaliada em relação à duração da doença, a frequência de pacientes com apenas 1 biomarcador foi menor dentre aqueles com maior tempo de doença (>10 anos), comparado com os que apresentavam apenas 0-2 anos de doença (1,5% vs 11,1%;  $p=0,0392$ ) e houve uma tendência ( $p=0,0508$ ) para o mesmo resultado, comparando-se os mesmos com os que apresentavam >2-10 anos (1,5% vs 9,2%; TABELA 8).

TABELA 6 - DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR E SUAS ASSOCIAÇÕES COM OS BIOMARCADORES

Características	Número de marcadores positivos					p
	0 marcador	1 marcador	2 marcadores	3 marcadores	4 marcadores	
	(N=28) N(%)	(N=15) N(%)	(N=28) N(%)	(N=42) N(%)	(N=97) N(%)	
Feminino	26/28 (92,8)	9/15 (60)	25/28 (89,28)	42/42 (100)	76/97 (78,35)	0,0006 <sup>a</sup>
Idade início doença (mediana/ anos)	18 - 75 (41,5;IIQ 27,2-48,7)	24 - 69 (46,0;IIQ 35,0-53,0)	19 - 69 (43,5;IIQ 31,5-50,0)	18 – 83 (43,5;IIQ 30-49,7)	16 – 71 (46;IIQ 32,7-52,0)	0,50 <sup>c</sup>
18 a 30 anos	10/28 (35,7)	2/15 (13,3)	6/28 (21,4)	12/42 (28,6)	21/96 (21,9)	0,4336 <sup>a</sup>
>30 anos	16/28 (57,1)	11/15 (73,3)	21/28 (75)	26/42 (61,9)	70/96 (72,9)	0,3911 <sup>a</sup>
>60 anos	2/28 (7,1)	2/15 (13,3)	1/28 (3,6)	4/42 (9,5)	5/96 (5,2)	0,6661 <sup>a</sup>
Idade (média) em anos	48,21±10,42	50,27±12,89	50,11±11,90	52,93±13,79	51,67±11,35	0,55 <sup>d</sup>
Duração doença (mediana/ anos)	1 - 28 (7,0; IIQ 3,0- 12,75)	1 - 27 (4,0; IIQ de 2,0 -7,0)	1 – 35 (7,5; IIQ 3,2 -14,2)	1 – 60 (7,0; IIQ 3,0-11,7)	1 – 36 (6,5;IIQ 3,2- 12,0)	0,36 <sup>c</sup>
0 a 2 anos	6/28 (21,4)	5/15 (33,3)	5/28 (17,9)	9/42 (21,4)	20/96 (20,8)	0,8287 <sup>a</sup>
>2 a 10 anos	12/28 (42,9)	9/15 (60)	14/28 (50)	19/42 (45,2)	44/96 (45,8)	0,8414 <sup>a</sup>
>10 anos	10/28 (35,7)	1/15 (6,7)	9/28 (32,1)	14/42 (33,3)	32/96 (33,3)	0,3160 <sup>a</sup>

NOTAS: As comparações foram realizadas por diferentes testes de acordo com a distribuição e tamanho da amostra; <sup>a</sup> Qui-quadrado; <sup>b</sup> Teste exato de Fisher;

<sup>c</sup> Teste Kruskal-Wallis; <sup>d</sup> Anova (one way); IIQ= intervalo interquartil

TABELA 6 – DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM AR E SUAS ASSOCIAÇÕES COM OS BIOMARCADORES

Características	Número de marcadores positivos					p
	0 marcador	1 marcador	2 marcadores	3 marcadores	4 marcadores	
	(N=28) N(%)	(N=15) N(%)	(N=28) N(%)	(N=42) N(%)	(N=97) N(%)	
Classe Funcional						
Classe I	15/28 (53,6)	8/15 (53,3)	13/28 (46,4)	22/42 (52,4)	41/96 (42,7)	0,7513 <sup>a</sup>
Classe II	10/28 (35,7)	6/15 (40)	11/28 (39,3)	17/42 (40,5)	39/96 (40,6)	0,9937 <sup>a</sup>
Classe III+IV	3/28 (10,7)	1/15 (6,7)	4/28 (14,3)	3/42 (7,1)	16/96 (16,7)	0,5358 <sup>a</sup>
Euro-descendentes	18/24 (75)	10/13 (76,9)	17/26 (65,4)	28/38 (73,7)	58/79 (73,4)	0,91 <sup>a</sup>
Afrodescendentes	6/24 (25)	3/13 (23,1)	9/26 (34,6)	10/38 (26,3)	20/79 (25,3)	0,9043 <sup>a</sup>
Exposição ao tabaco	13/25 (52)	7/12 (58,3)	12/26 (46,1)	16/39 (41,02)	39/87 (44,8)	0,82 <sup>a</sup>
Nódulos	2/24 (8,33)	0/13 (0)	4/28 (14,28)	1/37 (2,7)	10/88 (11,36)	0,32 <sup>a</sup>
Síndrome Sjögren	1/19 (5,2)	3/11 (27,2)	4/24 (16,6)	16/33 (48,4)	25/75 (33,3)	0,009 <sup>a</sup>
Fibrose Pulmonar	1/22 (4,50)	1/11(9,0)	2/24 (8,3)	5/32 (15,6)	6/72 (8,3)	0,68 <sup>a</sup>

NOTAS: : As comparações foram realizadas por diferentes testes de acordo com a distribuição e tamanho da amostra; <sup>a</sup> Qui-quadrado; <sup>b</sup> Teste exato de Fisher; <sup>c</sup> Teste Kruskal-Wallis; <sup>d</sup> Anova (one way); IIQ= intervalo interquartil

TABELA 7 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AO GÊNERO

Biomarcadores (N)	PACIENTES		p
	Feminino N (%)	Masculino N (%)	
4 (97)	76 (42,7)	21 (65,6)	0,0206 <sup>1</sup>
3 (42)	42 (23,6)	0 (0)	0,0006 <sup>2</sup>
2 (28)	25 (14)	3 (9,4)	ns
1 (15)	9 (5,1)	6 (18,8)	0,0144 <sup>3</sup>
neg (28)	26 (14,6)	2 (6,2)	ns
210 pacientes	178	32	

LEGENDA: <sup>1</sup> 4 biomarcadores: gênero masculino vs feminino: p= 0,0206

<sup>2</sup> 3 biomarcadores: gênero feminino vs masculino: p= 0,0006

<sup>3</sup> 1 biomarcador: gênero masculino vs feminino: p= 0,0144

NOTA: Teste exato de Fisher

TABELA 8 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AO TEMPO DE DURAÇÃO DA DOENÇA

Biomarcadores (N)	PACIENTES			p
	0-2 anos (%)	>2 a 10 anos (%)	>10 anos (%)	
4 (96)	20 (44,5)	44 (44,9)	32 (48,5)	ns
3 (42)	9 (20)	19 (19,4)	14 (21,2)	ns
2 (28)	5 (11,1)	14 (14,3)	9 (13,6)	ns
1 (15)	5 (11,1)	9 (9,2)	1 (1,5)	0,0392 <sup>1</sup> 0,0508 <sup>2</sup>
neg (28)	6 (13,3)	12 (12,2)	10 (15,2)	ns
209 pacientes	45	98	66	

LEGENDA: <sup>1</sup> Duração da doença 1 biomarcador: 0-2 anos vs >10 anos: p= 0,0392

<sup>2</sup> Duração da doença 1 biomarcador: >2 a 10 anos vs >10 anos: p= 0,0508

ns= não significativo

NOTA: Teste exato de Fisher



Nas demais comparações o número de biomarcadores concomitantes não foi associado com a duração da doença, tampouco com a idade de início da doença, avaliada nos grupos de 18-30 anos, >30 anos e >60 anos (TABELA 9).

TABELA 9 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA

Biomarcadores (N)	PACIENTES			p
	18-30 anos (%)	> 30 anos (%)	> 60 anos (%)	
4 (96)	21 (41,2)	70 (48,6)	5 (35,7)	ns
3 (42)	12 (23,5)	26 (18,1)	4 (28,6)	ns
2 (28)	6 (11,8)	21 (14,6)	1 (7,1)	ns
1 (15)	2 (3,9)	11 (7,6)	2 (14,3)	ns
neg (28)	10 (19,6)	16 (11,1)	2 (14,3)	ns
209 pacientes	51	144	14	

LEGENDA: ns= não significativo

NOTA: Teste exato de Fisher

O número de biomarcadores concomitantes não apresentou relação com a classe funcional da doença (TABELAS 6 e 10). Dos 209 pacientes avaliados, 47,4% (99/209) pertenciam à classe I, 39,7% (83/209) à classe II e 12,9% (27/209) às classes III/IV. Dentre os pacientes com AR de classe III e IV, a maior parte apresentou 4 biomarcadores (16/27 ou 59,3%). Contudo, o mesmo foi observado para as demais classes (TABELA 10).

TABELA 10 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CLASSE FUNCIONAL

Biomarcadores (N)	PACIENTES			p
	Classe I (%)	Classe II (%)	Classe III e IV (%)	
4 (96)	41 (41,4)	39 (47)	16 (59,3)	ns
3 (42)	22 (22,2)	17 (20,5)	3 (11,1)	ns
2 (28)	13 (13,1)	11 (13,3)	4 (14,8)	ns
1 (15)	8 (8,1)	6 (7,2)	1 (3,7)	ns
Neg (28)	15 (15,2)	10 (12)	3 (11,1)	ns
209 pacientes	99	83	27	

LEGENDA: ns= não significativo

NOTA: Teste exato de Fisher

Em relação ao tabagismo, dentre os 87 pacientes fumantes (46%; 87/189), 39 (44,8%) apresentaram positividade para 4 biomarcadores, 16 (18,4%) para 3 biomarcadores, 12 (13,8%) para 2 biomarcadores, 7 (8%) para 1 biomarcador e 13 (14,9%) indivíduos apresentaram sorologia negativa para os autoanticorpos. Não foi encontrada diferença significativa em relação ao número de biomarcadores concomitantes ao se comparar o grupo de pacientes fumantes e não fumantes (TABELA 11).

TABELA 11 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AO TABAGISMO

PACIENTES			
Biomarcadores	Tabagista	Não Tabagista	p
(N)	(%)	(%)	
4 (87)	39 (44,8)	48 (47)	ns
3 (39)	16 (18,4)	23 (22,5)	ns
2 (26)	12 (13,8)	14 (13,7)	ns
1 (12)	7 (8)	5 (4,9)	ns
neg (25)	13 (14,9)	12 (11,8)	ns
<b>189 pacientes</b>	<b>87</b>	<b>102</b>	

LEGENDA: ns= não significativo

NOTA: Teste exato de Fisher

Dentre as características clínicas, houve tendência à associação entre presença de manifestações extra-articulares (MEA) e 3 biomarcadores concomitantes, em relação a pacientes sem MEA (27,5% vs 15,5%;  $p=0,0598$ ). Ao contrário, a maior parte dos pacientes sem biomarcadores não apresentou MEA (5,8% vs 17,8%;  $p=0,0179$ ;  $OR=0,2836$ ;  $95\%IC=0,09-0,86$ ; TABELA 12).

Quando as MEA foram analisadas separadamente (nódulos reumatoides, fibrose pulmonar e síndrome de Sjögren secundária), observou-se que a associação se devia à síndrome de Sjögren (TABELA 13). Entre os pacientes positivos para 3 biomarcadores, predominaram aqueles que apresentavam síndrome de Sjögren (32,6% vs 15%;  $p=0,0182$ ;  $OR=2,73$ ;  $95\%IC=1,24-6,08$ ), e entre os pacientes sorologicamente negativos, foi possível observar uma frequência aumentada de

indivíduos que não apresentavam esta MEA (15,9% vs 2%;  $p=0,0143$ ;  $OR=0,11$ ;  $95\%IC=0,014-0,84$ ; TABELA 13).

TABELA 12 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES (MEA)

PACIENTES			
Biomarcadores	com MEA	sem MEA	p
(N)	(%)	(%)	
4 (90)	34 (49,3)	56 (43,4)	ns
3 (39)	19 (27,5)	20 (15,5)	0,0598 <sup>1</sup>
2 (28)	9 (13,1)	19 (14,7)	ns
1 (14)	3 (4,3)	11 (8,5)	ns
neg (27)	4 (5,8)	23 (17,8)	0,0179 <sup>2</sup>
198 pacientes	69	129	

LEGENDA: <sup>1</sup>Pacientes 3 biomarcadores: com MEA vs sem MEA;  $p=0,0598$

<sup>2</sup>Pacientes negativos: com MEA vs sem MEA;  $p=0,0179$ ;  $OR=0,2836$ ;  $95\%IC=0,09-0,86$

NOTA: Teste exato de Fisher

TABELA 13 – CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES MEA

PACIENTES							
Marcadores	Com Nódulo	Sem Nódulo	Com Fibrose	Sem Fibrose	Com Sjögren	Sem Sjögren	p
(N)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
4	10 (58,8)	78 (45,1)	6 (40)	72 (45)	25 (51)	50 (44,2)	ns
3	1 (5,9)	36 (20,8)	5 (33,3)	32 (20)	16 (32,6)	17 (15)	0,0182 <sup>1</sup>
2	4 (23,5)	24 (13,9)	2 (13,3)	24 (15)	4 (8,2)	20 (17,7)	ns
1	0 (0)	13 (7,5)	1 (6,7)	10 (6,2)	3 (6,1)	8 (7,1)	ns
Neg	2 (11,8)	22 (12,7)	1 (6,7)	22 (13,8)	1 (2)	18 (15,9)	0,0143 <sup>2</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>173</b>	<b>15</b>	<b>160</b>	<b>49</b>	<b>113</b>	

LEGENDA: <sup>1</sup>Pacientes 3 biomarcadores: com Sjögren vs sem Sjögren:  $p=0,0182$  ( $OR=2,73$ ;  $95\%IC=1,24-6,08$ )

<sup>2</sup>Pacientes negativos: com Sjögren vs sem Sjögren:  $p=0,0143$  ( $OR=0,11$ ;  $95\%IC=0,014-0,84$ )

NOTA: Teste exato de Fisher

Para alguns pacientes, não foi possível obter a idade de início da doença ou duração da mesma, assim como algumas informações clínicas ou sorológicas (N=210). Isto explica a variação no número total de indivíduos analisados (N), para alguns parâmetros

#### 5.1.5 Análise dos biomarcadores em relação aos dados demográficos, clínicos e sorológicos dos familiares de pacientes com AR

A associação dos dados demográficos, clínicos e sorológicos em relação aos biomarcadores nas amostras de familiares de pacientes com AR está demonstrada na TABELA 14. Aumento significativo na frequência de artralgia foi observado entre os familiares positivos para o FR-IgM (6/16, 37,5%;  $p=0,004$ ), anti-CCP (4/11, 36,4%;  $p=0,02$ ), anti-MCV (6/16, 37,5%;  $p=0,0006$ ), e tendência à significância para o FR-IgA (6/29, 20,7%;  $p=0,08$ ). Além disso, cada autoanticorpo positivo apresentou associação significativa com quase todos os biomarcadores positivos (TABELA 14).

Entre os familiares positivos, 5,77% (3/52) preencheram os critérios de diagnóstico para AR (duas mulheres e um homem). Todos estes possuíam altos títulos para os biomarcadores. Uma das mulheres tinha positividade para os quatro biomarcadores investigados e relatou quatro outros irmãos não-afetados na família. No entanto, um deles apresentava reação positiva para o anti-CCP. A outra familiar mulher afetada foi positiva para o anti-CCP e FR-IgM, enquanto o único familiar homem diagnosticado para a doença foi positivo apenas para o anti-CCP. Dois desses familiares afetados tinham queixas de dor e inchaço.

Outros oito familiares positivos que apresentaram altas concentrações de autoanticorpos e sintomas relacionados à doença, mas que ainda não preencheram os critérios diagnóstico para AR, estão sendo acompanhados clinicamente.

TABELA 14 – ASSOCIAÇÃO ENTRE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E SOROLÓGICOS COM A POSITIVIDADE DE BIOMARCADORES EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

	<b>FR-IgM<sup>+</sup> (N=16)</b>	<b>FR-IgM<sup>-</sup> (N=182)</b>	<b>p</b>
Euro-descendentes	14/16	140/182	0.53 <sup>a</sup>
Feminino	13/16	108/182	0.11 <sup>a</sup>
Exposição ao tabaco	3/16	54/182	0.56 <sup>a</sup>
Idade média	40.31±12.33	36.52±15.63	0.34 <sup>c</sup>
Artralgia	6/16	16/178	0.004* <sup>a</sup>
CCP <sup>+</sup>	5/16	6/182	0.0006* <sup>a</sup>
FR-IgA <sup>+</sup>	6/16	23/182	0.01* <sup>a</sup>
MCV <sup>+</sup>	5/16	11/182	0.004* <sup>a</sup>
	<b>FR-IgA<sup>+</sup> (N=29)</b>	<b>FR-IgA<sup>-</sup> (N=169)</b>	<b>p</b>
Euro-descendentes	24/29	130/169	0.63 <sup>a</sup>
Exposição ao tabaco	9/29	48/169	0.77 <sup>b</sup>
Feminino	17/29	104/169	0.76 <sup>b</sup>
Idade média	40.62±15.44	36.18±15.34	0.15 <sup>c</sup>
Artralgia	6/29	16/165	0.08 <sup>b</sup>
CCP <sup>+</sup>	4/29	7/169	0.059 <sup>a</sup>
FR-IgM <sup>+</sup>	6/29	10/169	0.007* <sup>b</sup>
MCV <sup>+</sup>	7/29	9/169	0.0006* <sup>b</sup>
	<b>Anti-CCP<sup>+</sup> (N=11)</b>	<b>Anti-CCP<sup>-</sup> (N=187)</b>	<b>p</b>
Euro-descendentes	9/11	145/187	0.73 <sup>a</sup>
Exposição ao Tabaco	3/11	54/187	1.00 <sup>a</sup>
Feminino	9/11	112/187	0.37 <sup>a</sup>
Idade média	39.36± 15.93	36.68± 15.40	0.57 <sup>c</sup>
Artralgia	4/11	18/183	0.02* <sup>a</sup>
FR-IgM <sup>+</sup>	5/11	11/187	0.0006* <sup>a</sup>
FR-IgA <sup>+</sup>	4/11	25/187	0.059 <sup>a</sup>
MCV <sup>+</sup>	5/11	11/187	0.0006* <sup>a</sup>
	<b>Anti-MCV<sup>+</sup> (N=16)</b>	<b>Anti-MCV<sup>-</sup> (N=182)</b>	<b>p</b>
Euro-descendentes	12/16	154 /182	0.29 <sup>a</sup>
Exposição ao Tabaco	4/16	53/182	1.00 <sup>a</sup>
Feminino	14/16	107/182	0.03* <sup>a</sup>
Idade Média	33.56±16.90	37.12±15.28	0.37 <sup>c</sup>
Artralgia	6/ 16	22/178	0.0006* <sup>a</sup>
CCP <sup>+</sup>	5/16	6/182	<0.0001* <sup>b</sup>
FR-IgM <sup>+</sup>	5/16	11/182	0.004* <sup>a</sup>
FR-IgA <sup>+</sup>	7/16	22/182	0.002* <sup>b</sup>

LEGENDA: p\* = valores considerados significativos ao nível de 0,05

NOTA: As comparações foram realizadas por diferentes testes, de acordo com a distribuição e tamanho da amostra; <sup>a</sup>Teste exato de Fisher; <sup>b</sup>Teste qui-quadrado; <sup>c</sup>Teste T não pareado

## 5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES

Dentre os 210 pacientes com AR em estudo, foi possível realizar a determinação de BF em 180 desses, assim como em 198 familiares e 98 controles. A distribuição das frequências fenotípicas de BF observadas nos pacientes, familiares e controles está demonstrada na TABELA 15 e no GRÁFICO 6. A distribuição dos portadores dos alótipos e as frequências alotípicas de BF nos 3 grupos em estudo encontram-se nas TABELAS 16 E 17, respectivamente. A distribuição das frequências genotípicas satisfazem a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos investigados.

TABELA 15 – FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES.

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES N (%)	FAMILIARES N (%)	CONTROLES N (%)	p*
S	110 (61,1)	100 (50,5)	56 (57,2)	0,0391 <sup>(1)</sup>
SF	48 (26,7)	67 (33,8)	28 (28,6)	ns
F	11 (6,1)	12 (6,1)	5 (5,1)	ns
SS07	6 (3,3)	12 (6,1)	5 (5,1)	ns
FS07	3 (1,7)	6 (3)	1 (1)	ns
SF1	1 (0,6)	1 (0,5)	2 (2)	ns
FF1	1 (0,6)	0 (0)	1 (1)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>180 (100)</b>	<b>198 (100)</b>	<b>98 (100)</b>	

LEGENDA: N= número de indivíduos

Pacientes x controles = não significativo para todos os fenótipos

Familiares x controles = não significativo para todos os fenótipos

p\* = Pacientes x familiares <sup>(1)</sup>p=0,0391 (OR=1,49; 95%IC=0,92-2,42; p=0,109)

ns= não significante ao nível de 0,05.

NOTA: Teste exato de Fisher e regressão logística

Não houve diferença estatística entre a distribuição dos fenótipos e a dos alótipos de BF em pacientes com AR (n=180) e controles, e em familiares (n=198) e controles (TABELAS 15 e 16). Por sua vez, houve aumento significativo na frequência de BF S nos pacientes comparados aos familiares (61,1%, 110/180 nos pacientes x 50,5%, 100/198 nos familiares; p= 0,0391). Após correção por regressão logística para idade, gênero e tabagismo, houve perda da significância (OR=1,49; 95%IC=0,92-2,42, p=0,109).

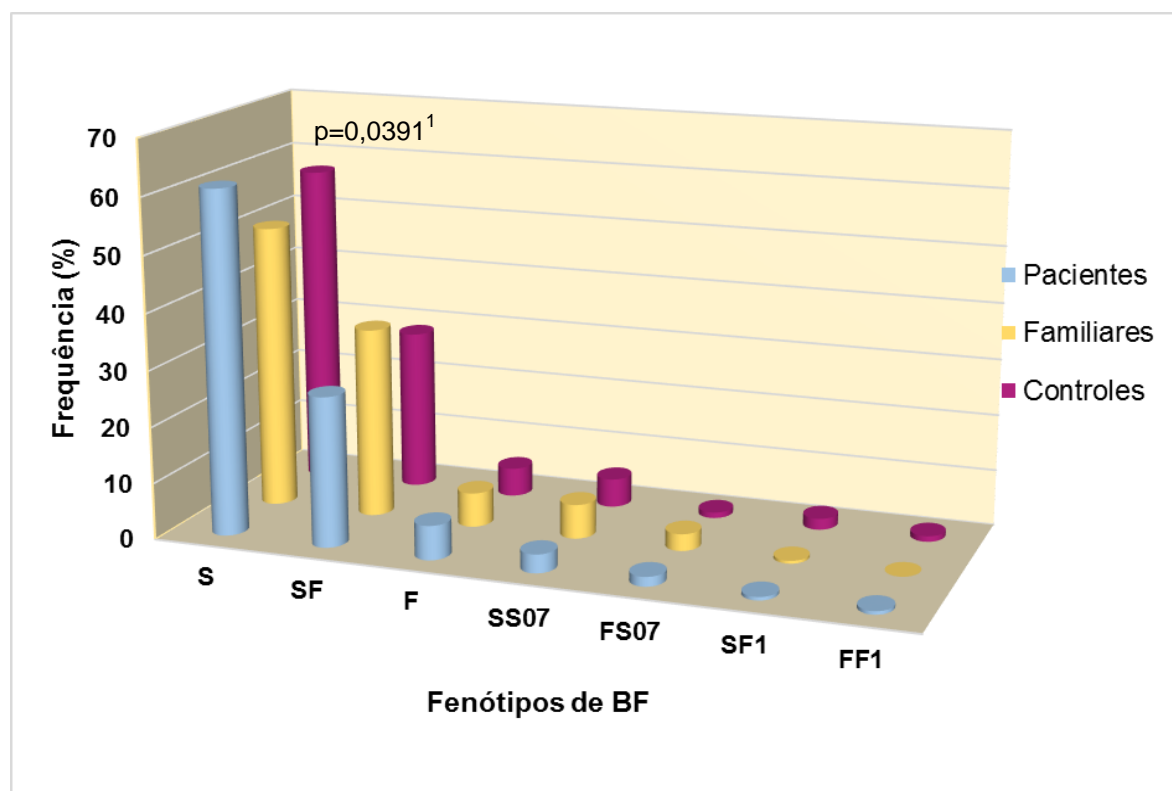


GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES

LEGENDA: Pacientes x controles = ns para todos os fenótipos

Familiares x controles = ns para todos os fenótipos

<sup>1</sup> Pacientes BF S x Familiares BF S:  $p=0,0391$  (OR=1,49, 95%IC=0,92-2,42,  $p=0,109$ )

TABELA 16 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES N (%)	FAMILIARES N (%)	CONTROLES N (%)	p*
S	165 (91,7)	180 (90,9)	91 (92,9)	ns
F	63 (35)	85 (42,9)	35 (35,7)	ns
F1	2 (1,1)	1 (0,50)	3 (3,1)	ns
S07	9 (5)	18 (9,09)	6 (6,1)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 180 pacientes</b>	<b>Em 198 familiares</b>	<b>Em 98 controles</b>	

LEGENDA: N= número de indivíduos em que o alótipo está presente

ns=não significante ao nível de 0,05

p\* = Pacientes x controles; familiares x controles; pacientes x familiares: ns para todas as análises

NOTA: Teste Exato de Fisher

TABELA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÓTIPOICAS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, FAMILIARES E CONTROLES.

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES (n=360)	FAMILIARES (n=396)	CONTROLES (n=196)
	Freq. Alotípica	Freq. Alotípica	Freq. Alotípica
S	0,763	0,707	0,750
F	0,206	0,245	0,204
F1	0,006	0,003	0,015
S07	0,025	0,045	0,031
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

LEGENDA: n= número de alótipos

Freq. Alotípica= Frequência alotípica

### 5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO GÊNERO

A proporção de indivíduos do gênero feminino para masculino foi de 5,7:1 entre os pacientes com AR (153 ♀; 27 ♂), 1,6:1 nos familiares (121 ♀; 77 ♂) e 4,8:1 no grupo controle (81 ♀; 17 ♂), que havia sido pareado com os pacientes.

Não se observou diferença significativa na análise da distribuição dos fenótipos de BF entre os indivíduos do gênero masculino e feminino nas amostras dos pacientes, familiares e controles (TABELA 18). Também não foi observada diferença entre os mesmos nas análises de distribuição dos alótipos de BF (APÊNDICE 5A).

Os resultados da comparação da distribuição dos fenótipos e alótipos de BF entre todos os grupos em estudo, analisando-se gênero feminino x feminino e gênero masculino x masculino não apresentou diferença estatística significativa para todas as análises.

A análise dos fenótipos e alótipos de BF realizada somente entre as mulheres com AR também não apresentou diferenças significantes em relação aos dados clínicos (idade de início da doença, idade ao diagnóstico da doença, classe funcional e presença de MEA).



TABELA 18 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO, EM RELAÇÃO AO GÊNERO DOS INDIVÍDUOS (F vs M)

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES N=180 (%)			FAMILIARES N=198 (%)			CONTROLES N=98 (%)			p*
	F	x	M	F	x	M	F	x	M	
S	94 (61,4)	16 (59,3)		59 (48,8)	41 (53,2)		46 (56,8)	10 (58,8)		ns
SF	41 (26,8)	7 (25,9)		43 (35,5)	24 (31,2)		22 (27,2)	6 (35,3)		ns
F	9 (5,9)	2 (7,4)		6 (5)	6 (7,8)		4 (4,9)	1 (5,9)		ns
SS07	5 (3,3)	1 (3,7)		9 (7,4)	3 (3,9)		5 (6,2)	0 (0)		ns
FS07	2 (1,3)	1 (3,7)		4 (3,3)	2 (2,6)		1 (1,2)	0 (0)		ns
SF1	1 (0,7)	0 (0)		0 (0)	1 (1,3)		2 (2,5)	0 (0)		ns
FF1	1 (0,7)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		1 (1,2)	0 (0)		ns
<b>TOTAL</b>	<b>153</b>	<b>27</b>		<b>121</b>	<b>77</b>		<b>81</b>	<b>17</b>		

LEGENDA: F=gênero feminino; M=gênero masculino

p\*= não significativo para todas as análises

ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

#### 5.4 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO AOS DADOS CLÍNICOS

Na presente análise, verificou-se a possibilidade de associação entre a doença e os fenótipos de BF, em 179 pacientes (TABELA 19). A comparação entre as 3 faixas etárias, 18-30 anos (N=44), >30 a 60 anos (N=125) e >60 anos (N=10), em relação à distribuição dos fenótipos de BF não resultou em diferença significativa. Também não foi observada diferença entre os grupos em relação aos portadores de alótipos de BF (APÊNDICE 5B).

Na TABELA 20 encontra-se a distribuição dos fenótipos de BF em relação à classe funcional, evidenciando-se que do total de 179 pacientes, 83 pertencem à classe I, 74 à classe II e 22 à classe III ou IV, não havendo diferença significativa entre os grupos. Também não foi observada diferença entre os mesmos em relação à distribuição dos alótipos de BF (APÊNDICE 5C).

TABELA 19 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR, EM RELAÇÃO À IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES			p*
	18-30 anos N(%)	>30 a 60 anos N(%)	>60 anos N(%)	
S (110)	26 (59,1)	77 (61,6)	7 (70)	ns
SF (47)	14 (31,8)	31 (24,8)	2 (20)	ns
F (11)	4 (9,1)	6 (4,8)	1 (10)	ns
SS07 (6)	-	6 (4,8)	-	ns
FS07 (3)	-	3 (2,4)	-	ns
SF1 (1)	-	1 (0,8)	-	ns
FF1 (1)	-	1 (0,8)	-	ns
<b>TOTAL (179)</b>	<b>44</b>	<b>125</b>	<b>10</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises

ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

TABELA 20 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CLASSE FUNCIONAL DA DOENÇA

FENÓTIPOS DE BF (N=179)	Classe I	Classe II	Classe III/ IV <sup>#</sup>	p*
	N (%)	N (%)	N (%)	
S (110)	51 (61,5)	44 (59,5)	15 (68,2)	ns
SF (47)	24 (28,9)	20 (27)	3 (13,6)	ns
F (11)	4 (4,8)	5 (6,8)	2 (9,1)	ns
SS07 (6)	2 (2,4)	2 (2,7)	2 (9,1)	ns
FS07 (3)	1 (1,2)	2 (2,7)	---	ns
SF1 (1)	1 (1,2)	---	---	ns
FF1 (1)	---	1 (1,3)	---	ns
<b>TOTAL (179)</b>	<b>83</b>	<b>74</b>	<b>22</b>	

LEGENDA: <sup>#</sup> as classes III e IV foram reunidas na análise devido ao baixo número de amostras

p\*= não significativo para todas as análises

ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

Foi possível analisar a distribuição dos fenótipos e alótipos de BF em 168 pacientes em relação à presença de manifestações extra-articulares (TABELA 21).

Pacientes com fenótipo BF FS07 (4,8%) apresentaram aumento significativo de MEA ( $p=0,0487$ ), não sendo possível fazer a correção do valor de “p” por regressão logística devido ao  $N=0$  em uma das categorias em análise nesse grupo. Não houve diferença significativa para os demais fenótipos. A comparação da distribuição dos portadores dos alótipos evidenciou associação significativa para presença de MEA com o alótipo BF\*S07 ( $p=0,0132$ ), mantendo-se a significância após correção por regressão logística simples, independente dos dados demográficos e tabagismo ( $OR=6,62$ ;  $95\%IC=1,33-32,95$ ;  $p=0,021$ ).

TABELA 21 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE MEA

FENÓTIPOS DE BF		Presença de MEA	Ausência de MEA	p
(N=168)		N (%)	N (%)	
S	(100)	31 (50)	69 (65,1)	ns
SF	(46)	18 (29)	28 (26,4)	ns
F	(11)	4 (6,5)	7 (6,6)	ns
SS07	(6)	4 (6,5)	2 (1,9)	ns
FS07	(3)	3 (4,8)	0	0,0487 <sup>(1)</sup>
SF1	(1)	1 (1,6)	0	ns
FF1	(1)	1 (1,6)	0	ns
<b>ALÓTIPOS DE BF</b>				
S		54 (87,1)	99 (93,4)	ns
F		26 (41,9)	35 (33)	ns
F1		2 (3,2)	0	ns
S07		7 (11,3)	2 (1,9)	0,0132 <sup>(2)</sup>
<b>TOTAL (168)</b>		<b>Em 62 pacientes</b>	<b>Em 106 pacientes</b>	

LEGENDA: <sup>1</sup> Fenótipo BF FS07: pacientes com MEA vs pacientes sem MEA,  $p=0,0487$

<sup>2</sup> Alótipo BF\*S07: pacientes com MEA vs pacientes sem MEA,  $p=0,0132$   
( $OR=6,62$ ;  $95\%IC=1,33-32,95$ ;  $p=0,021$ )

ns=não significativa ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher e regressão logística

Dentre as MEA detectadas nos pacientes em estudo, tem-se a presença de nódulos reumatoides (NR) em 9,4% (15/160) destes, fibrose pulmonar (FP) em 8,9% (13/146) e síndrome de Sjögren secundária (SS) em 31,6% (43/136). Na TABELA 22 pode-se observar a distribuição dos fenótipos de BF em relação a estas MEAs nos pacientes. Houve associação entre o fenótipo BF FS07 e a síndrome de Sjögren (3/43, 7% vs 0/93, 0%;  $p=0,0301$ ). A distribuição dos portadores de alótipos não diferiu com relação á presença dos diferentes tipos de MEA (APÊNDICE 5D).

TABELA 22 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES

Fenótipos de BF	PACIENTES						p*
	Com NR	Sem NR	Com FP	Sem FP	Com SS	Sem SS	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	6 (40)	89 (61,4)	7 (53,8)	81 (60,9)	23 (43,4)	58 (62,4)	ns
SF	6 (40)	37 (25,5)	3 (23,1)	37 (27,8)	12 (27,9)	24 (25,8)	ns
F	1 (6,7)	10 (6,9)	2 (15,4)	7 (5,3)	2 (4,7)	6 (6,4)	ns
SS07	2 (13,3)	4 (2,8)	0	4 (3)	2 (4,7)	4 (4,3)	ns
FS07	0	3 (2,1)	0	3 (2,3)	3 (7)	0	0,0301 <sup>(1)</sup>
SF1	0	1 (0,69)	1 (7,7)	0	0	1 (1,1)	ns
FF1	0	1 (0,69)	0	1 (0,75)	1 (2,3)	0	ns
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>145</b>	<b>13</b>	<b>133</b>	<b>43</b>	<b>93</b>	

LEGENDA: NR: nódulo reumatoide; FP: fibrose pulmonar; SS: síndrome Sjögren secundária

<sup>1</sup> Fenótipo BF FS07: pacientes com SS vs pacientes sem SS, p=0,0301

\*p: Demais comparações: não significantes para todos os fenótipos

ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS FAMILIARES DE PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE ARTRALGIA

Entre os familiares de pacientes com AR avaliados, 11,2% (22/197) queixaram-se de artralgia, enquanto os demais (88,8%) não apresentaram tal sintoma. A distribuição dos fenótipos de BF nos familiares não apresentou diferença significativa em relação à artralgia (TABELA 23), assim como a distribuição dos portadores de alótipos de BF (APÊNDICE 5 E).

TABELA 23 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF NOS FAMILIARES DE PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À ARTRALGIA

FENÓTIPOS DE BF	Familiares com Artralgia N (%)	Familiares sem Artralgia N (%)	p*
S	11 (50)	89 (50,8)	ns
SF	7 (31,8)	59 (33,7)	ns
F	1 (4,5)	11 (6,3)	ns
SS07	2 (9,1)	10 (5,7)	ns
FS07	1 (4,5)	5 (2,9)	ns
SF1	0	1 (0,6)	ns
FF1	0	0	
<b>TOTAL</b>	<b>Em 22 familiares</b>	<b>Em 175 familiares</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises

ns=não significativo ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

## 5.6 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E ALÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AOS BIOMARCADORES PARA AR

Todas as amostras dos pacientes (N=180) e familiares (N=198) tipados para o BF foram investigadas em relação à positividade de quatro diferentes biomarcadores da AR, sendo eles: o anticorpo anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA (TABELA 24).

Analisando-se a TABELA 24, foi possível verificar ausência de associação entre a distribuição dos fenótipos de BF e a positividade dos biomarcadores

pesquisados nas amostras dos pacientes e familiares. O mesmo ocorreu em relação à distribuição dos portadores dos alótipos de BF (APÊNDICE 5F).

TABELA 24 – ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES EM RELAÇÃO À POSITIVIDADE DOS BIOMARCADORES

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES (N=180)				p*
	Anti-CCP positivo N (%)	Anti-MCV positivo N (%)	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgA positivo N (%)	
S	83 ( 61 )	80 (64,5)	75 (61,5)	69 (60,5)	ns
SF	38 (27,9)	34 (27,4)	30 (24,6)	31 (27,2)	ns
F	8 (5,9)	4 (3,2)	8 (6,6)	6 (5,3)	ns
SS07	4 (2,9)	4 (3,2)	4 (3,3)	3 (2,6)	ns
FS07	3 (2,2)	2 (1,6)	3 (2,5)	3 (2,6)	ns
SF1	0	0	1 (0,8)	1 (0,9)	ns
FF1	0	0	1 (0,8)	1 (0,9)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>136</b>	<b>124</b>	<b>122</b>	<b>114</b>	
	FAMILIARES (N=198)				
	Anti-CCP positivo N (%)	Anti-MCV positivo N (%)	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgA positivo N (%)	
S	5 (45,4)	5 (31,2)	7 (43,8)	10 (34,5)	ns
SF	2 (18,2)	7 (43,8)	5 (31,2)	13 (44,8)	ns
F	1 ( 9,1 )	1 (6,2)	1 ( 6,2 )	1 (3,4)	ns
SS07	2 (18,2)	1 (6,2)	2 (12,5)	2 (6,9)	ns
FS07	1 ( 9,1 )	2 (12,5)	1 (6,2 )	3 (10,3)	ns
SF1	0	0	0	0	ns
FF1	0	0	0	0	ns
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>29</b>	

LEGENDA: Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado  
 Anti-MCV: anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada  
 FR-IgM: fator reumatoide classe IgM  
 FR-IgA: fator reumatoide classe IgA  
 p\*= não significativo para todas as análises  
 ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

Os fenótipos e alótipos de BF foram analisados nas amostras dos pacientes com AR em relação à concomitância dos biomarcadores sorológicos (TABELA 25). Apenas os pacientes com o fenótipo BF F e positivos para 3 biomarcadores concomitantes foram significativamente mais frequentes (13,2%), que os com o mesmo fenótipo, positivos para 4 biomarcadores (2,5%; p=0,0358). A análise após

regressão logística simples continuou apresentando significância, independente dos dados demográficos e tabagismo (OR=0,18; 95%IC=0,03-0,96; p=0,044).

A comparação na distribuição dos portadores de alótipos de BF não apresentou diferença estatística significativa, em relação à concomitância de biomarcadores no grupo de pacientes (APÊNDICE 5G).

TABELA 25 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE EM RELAÇÃO À CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES

FENÓTIPOS DE BF	PACIENTES (N=180)					p
	NÚMERO DE BIOMARCADORES					
	4	3	2	1	NEG	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	51 (64,6 )	23 (60,5)	15 (57,8)	8 (61,5)	15 (62,5)	ns
SF	21 (26,6)	9 (23,7)	7 (27)	3 (23,1)	6 (25)	ns
F	2 (2,5)	5 (13,2)	1 (3,8)	1 (7,7)	2 (8,3)	0,0358 <sup>1</sup>
SS07	3 (3,8)	0	1 (3,8)	1 (7,7)	1 (4,2)	ns
FS07	2 (2,5)	1 (2,6)	0	0	0	ns
SF1	0	0	1 (3,8)	0	0	ns
FF1	0	0	1 (3,8)	0	0	ns
TOTAL	79	38	26	13	24	

LEGENDA: <sup>(1)</sup>Pacientes fenótipo BF F 4 biomarcadores vs 3 biomarcadores; p=0,0358 (OR=0,18; 95%IC=0,03-0,96; p=0,044)

ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher e regressão logística

O pequeno número de familiares que apresentaram positividade concomitante para os biomarcadores inviabilizou a análise da distribuição dos fenótipos e portadores dos alótipos de BF.

A distribuição dos fenótipos e dos portadores dos alótipos de BF nos pacientes anti-CCP positivos (136/180; 75,6%) foi similar à observada nos pacientes anti-CCP negativos (44/180; 24,4%). Na análise em relação ao anti-MCV, pacientes com fenótipo BF F anti-MCV positivos foram menos frequentes quando comparados aos anti-MCV negativos (4/124; 3,2% vs 7/56; 12,5%; p=0,0371), mantendo-se a significância após correção por regressão logística no modelo reduzido para gênero e idade (OR=0,22; 95%IC=0,06-0,80; p=0,021; TABELA 26).

Em relação à distribuição dos portadores dos alótipos ocorreu aumento significativo de pacientes anti-MCV positivos com alótipo BF\*S, comparados aos



anti-MCV negativos (118/124; 95,2% vs 47/56; 83,9%;  $p=0,0182$ ). Tal significância manteve-se após correção por regressão logística simples ( $OR=3,77$ ; 95%IC=1,27-11,17;  $p=0,017$ ), caracterizando uma associação deste alótipo com maior predisposição ao desenvolvimento de anticorpos anti-MCV em pacientes com AR (TABELA 26).

TABELA 26 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS E PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM AR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTI-CCP E ANTI-MCV

FENÓTIPOS DE BF	Anti-CCP positivo N (%)	Anti-CCP negativo N (%)	p	Anti-MCV positivo N (%)	Anti-MCV negativo N (%)	p
S (110)	83 (61)	27 (61,4)	ns	80 (64,5)	30 (53,6)	ns
SF (48)	38 (27,9)	10 (22,7)	ns	34 (27,4)	14 (25)	ns
F (11)	8 (5,9)	3 (6,8)	ns	4 (3,2)	7 (12,5)	0,0371 <sup>(1)</sup>
SS07(6)	4 (2,9)	2 (4,8)	ns	4 (3,2)	2 (3,6)	ns
FS07(3)	3 (2,2)	0 (0)	ns	2 (1,6)	1 (1,8)	ns
SF1 (1)	0 (0)	1 (2,3)	ns	0 (0)	1 (1,8)	ns
FF1 (1)	0 (0)	1 (2,3)	ns	0 (0)	1 (1,8)	ns
<b>PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF</b>						
S	125 (91,9)	40 (90,9)	ns	118 (95,2)	47 (83,9)	0,0182 <sup>(2)</sup>
F	49 (36)	14 (31,8)	ns	40 (32,3)	23 (41,1)	ns
F1	0 (0)	2 (4,5)	ns	0 (0)	2 (3,6)	ns
S07	7 (5,2)	2 (4,5)	ns	6 (4,8)	3 (5,4)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 136 pacientes</b>	<b>Em 44 pacientes</b>		<b>Em 124 pacientes</b>	<b>Em 56 pacientes</b>	

LEGENDA: <sup>(1)</sup> Fenótipo BF F: pacientes anti-MCV<sup>+</sup> vs pacientes anti-MCV<sup>-</sup>;  $p=0,0371$  ( $OR=0,22$ ; 95%IC=0,06-0,80;  $p=0,021$ )

<sup>(2)</sup> Alótipo BF\* S: pacientes anti-MCV<sup>+</sup> vs pacientes anti-MCV<sup>-</sup>;  $p=0,0182$  ( $OR=3,77$ ; 95%IC=1,27-11,17;  $p=0,017$ )

ns=não significativo ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher e regressão logística

A comparação entre pacientes FR-IgM (122/180; 67,7%) e FR-IgA (114/180; 63,3%) positivos com os negativos, tanto em relação aos fenótipos de BF (TABELA 27) como aos alótipos de BF (APÊNDICE 5 H), caracterizou resultados que não atingiram significância estatística.

TABELA 27 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA

FENÓTIPOS DE BF	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgM negativo N (%)	p	FR-IgA positivo N (%)	FR-IgA negativo N (%)	p
S (110)	75 (61,5)	35 (60,3)	ns	69 (60,5)	41 (62)	ns
SF (48)	30 (24,6)	18 (31)	ns	31 (27,2)	17 (25,8)	ns
F (11)	8 (6,6)	3 (5,2)	ns	6 (5,3)	5 (7,6)	ns
SS07(6)	4 (3,3)	2 (3,4)	ns	3 (2,6)	3 (4,5)	ns
FS07(3)	3 (2,5)	0 (0)	ns	3 (2,6)	0 (0)	ns
SF1 (1)	1 (0,8)	0 (0)	ns	1 (0,9)	0 (0)	ns
FF1 (1)	1 (0,8)	0 (0)	ns	1 (0,9)	0 (0)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 122 pacientes</b>	<b>Em 58 pacientes</b>		<b>Em 114 pacientes</b>	<b>Em 66 pacientes</b>	

LEGENDA: ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

Na TABELA 28 tem-se a distribuição dos fenótipos de BF nos familiares de pacientes com AR que apresentaram resultados positivos para o anti-CCP (11/198; 5,6%) e anti-MCV (16/198; 8,1%) e aqueles que foram negativos para os mesmos. Não houve diferença significativa entre estes em relação aos fenótipos de BF, nem em relação à distribuição de portadores dos alótipos de BF (APÊNDICE 5 I).

Os familiares FR-IgM positivos (16/198; 8,1%) não diferiram significativamente dos familiares FR-IgM negativos (182/198; 91,9%) em relação à distribuição dos fenótipos e de portadores dos alótipos de BF (TABELA 29, APÊNDICE 5 J). Por sua vez, familiares com o fenótipo BF FS07 e FR-IgA positivos foram mais frequentes comparados aos BF FS07 e FR-IgA negativos (3/29; 10,3% vs 3/169; 1,8%;  $p=0,0419$ ), permanecendo a significância após correção por regressão logística pelo modelo reduzido para idade ( $OR= 7,78$ ; 95%IC=1,43-42,46;  $p=0,018$ ; TABELA 29). Os familiares não apresentaram diferença significativa em relação à positividade para o FR-IgA e distribuição de portadores dos alótipos de BF (APÊNDICE 5 J).

TABELA 28 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTI-CCP E ANTI-MCV

FENÓTIPOS DE BF	Anti-CCP positivo N (%)	Anti-CCP negativo N (%)	p	Anti-MCV positivo N (%)	Anti-MCV negativo N (%)	p
S (100)	5 (45,4)	95 (50,8)	ns	5 (31,2)	95 (52,2)	ns
SF (67)	2 (18,2)	65 (34,8)	ns	7 (43,8)	60 (33)	ns
F (12)	1 (9,1)	11 (5,9)	ns	1 (6,2)	11 (6)	ns
SS07(12)	2 (18,2)	10 (5,4)	ns	1 (6,2)	11 (6)	ns
FS07(6)	1 (9,1)	5 (2,7)	ns	2 (12,5)	4 (2,2)	ns
SF1 (1)	0 (0)	1 (0,5)	ns	0 (0)	1 (0,6)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 11 familiares</b>	<b>Em 187 familiares</b>		<b>Em 16 familiares</b>	<b>Em 182 familiares</b>	

LEGENDA: ns=não significante ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

TABELA 29 – DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA

FENÓTIPOS DE BF	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgM negativo N (%)	p	FR-IgA positivo N (%)	FR-IgA negativo N (%)	p
S (100)	7 (43,8)	93 (51,1)	ns	10 (34,5)	90 (53,2)	ns
SF (67)	5 (31,2)	62 (34,1)	ns	13 (44,8)	54 (32)	ns
F (12)	1 (6,2)	11 (6)	ns	1 (3,4)	11 (6,5)	ns
SS07(12)	2 (12,5)	10 (5,5)	ns	2 (6,9)	10 (5,9)	ns
FS07(6)	1 (6,2)	5 (2,7)	ns	3 (10,3)	3 (1,8)	0,0419 <sup>(1)</sup>
SF1 (1)	0 (0)	1 (0,6)	ns	0 (0)	1 (0,6)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 16 familiares</b>	<b>Em 182 familiares</b>		<b>Em 29 familiares</b>	<b>Em 169 familiares</b>	

LEGENDA: <sup>(1)</sup> Fenótipo BF FS07: familiares FR-IgA<sup>+</sup> vs familiares FR-IgA<sup>-</sup>; p=0,0419

(OR= 7,78; 95%IC=1,43-42,46; p=0,018)

ns=não significante a nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher e regressão logística

Os QUADROS 1 e 2 sumarizam as principais associações entre os biomarcadores, fenótipos e alótipos de BF e a AR observadas nesse estudo.

QUADRO 1 – SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES E A AR

POSITIVIDADE DE BIOMARCADORES	GRUPOS DE COMPARAÇÃO	VALOR DE “p”
Positividade Total	Pacientes vs Controles; Pacientes vs Familiares	p<0,0001
Anti-CCP+, anti-MCV+, FR-IgM+, FR-IgA+	Pacientes vs Controles; Pacientes vs Familiares	p<0,0001
FR-IgA+	Familiares vs Controles	p=0,030
Anti-CCP+ vs FR-IgA+	Pacientes	p=0,0318
FR-IgA+ vs Anti-CCP+	Familiares	p=0,0041
4 biomarcadores <sup>+</sup> vs 3,2,1 biomarcadores <sup>+</sup>	Pacientes	p<0,0001
1 biomarcador <sup>+</sup> vs 4,3,2 biomarcadores <sup>+</sup>	Familiares	p<0,0001
1 biomarcador <sup>+</sup> vs 4,3 biomarcadores <sup>+</sup>	Controles	p=0,0002
4 biomarcadores +	Pacientes masculinos vs Pacientes femininos	p=0,0206
0 biomarcadores (soronegativos)	Pacientes sem MEA vs pacientes com MEA	p=0,0179
3 biomarcadores +	Pacientes com Síndrome Sjögren vs Pacientes sem Síndrome Sjögren	p=0,0182
0 biomarcadores (soronegativos)	Pacientes sem Síndrome Sjögren vs Pacientes com Síndrome Sjögren	p=0,0143
FR-IgM=fator reumatoide IgM	Anti-CCP= anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado	
FR-IgA=fator reumatoide IgA	Anti-MCV=anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada	
MEA= manifestações extra-articulares		

QUADRO 2 – SINOPSE DAS PRINCIPAIS ASSOCIAÇÕES ENTRE OS FENÓTIPOS E PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF E A AR

FENÓTIPOS E ALÓTIPOS	GRUPOS DE COMPARAÇÃO	VALORES DE “p”
↑ BF S	Pacientes vs Familiares	p=0,0391; p <sub>Reg</sub> =0,109; OR=1,49; IC=0,92–2,42
↑ BF FS07	Pacientes com MEA vs pacientes sem MEA	p=0,0487
↑ BF *S07	Pacientes com MEA vs Pacientes sem MEA	p=0,0132; p <sub>Reg</sub> =0,021; OR=6,62; IC=1,33–32,95
↑BF FS07	Pacientes com Síndrome Sjögren vs Pacientes sem Síndrome Sjögren	p=0,0301
↓BF F	Pacientes anti-MCV <sup>+</sup> vs Pacientes anti-MCV <sup>-</sup>	p=0,0371; p <sub>Reg</sub> =0,021; OR=0,22; IC=0,06–0,80
↑BF *S	Pacientes anti-MCV <sup>+</sup> vs Pacientes anti-MCV <sup>-</sup>	p=0,0182; p <sub>Reg</sub> =0,017; OR=3,77; IC=1,27–11,17
↑BF FS07	Familiares FR-IgA <sup>+</sup> vs Familiares FR-IgA <sup>-</sup>	p=0,0419; p <sub>Reg</sub> =0,018; OR=7,78; IC=1,43–42,46
FR-IgM=fator reumatoide IgM FR-IgA=fator reumatoide IgA MEA= manifestações extra-articulares	Anti-CCP= anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado Anti-MCV=anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada p <sub>Reg</sub> =valor de “p” corrigido por regressão logística IC = intervalo de confiança	↑=frequência aumentada ↓=frequência diminuída OR=odds ratio

## 6 – DISCUSSÃO

Desde 1987, o diagnóstico da AR se baseava nos critérios do ACR. Em 2010, estes foram substituídos pelos critérios do ACR/EULAR. Esses dois grupos de critérios classificatórios se baseiam principalmente em sintomas clínicos, que sabidamente não se manifestam na sua totalidade no curso inicial da doença. De fato, apenas 52-80% dos pacientes preenchem esses critérios na AR inicial (EMERY *et al.*, 2002; MACHOLD *et al.*, 2002; VISSER *et al.*, 2002). Por sua vez, uma intervenção precoce é crucial para prevenir a progressão de danos irreversíveis nas articulações (LANDEWE, 2003; SINGH *et al.*, 2010).

Atualmente, terapias sofisticadas e efetivas que controlam a doença desde a fase inicial se encontram disponíveis. No entanto, para que o paciente possa usufruir deste benefício a tempo, faz-se necessário o uso de biomarcadores sorológicos sensíveis e específicos para auxiliar o diagnóstico da AR em estágios primários.

Tendo em vista o papel da via alternativa (VA) do sistema complemento na fisiopatogenia da AR (BANDA *et al.*, 2006; HAPPONEN *et al.*, 2012), e a já descrita relação do anticorpo anti-CCP na ativação dessa via (TROUW *et al.*, 2009), o presente estudo buscou aprofundar o entendimento de uma possível relação entre os 4 biomarcadores estudados e os diferentes alótipos de BF, a proteína central da VA. A hipótese que tais biomarcadores têm um papel que vai além de um instrumento precoce de diagnóstico, e que seu papel prognóstico possa, entre outros aspectos, estar conectado com a ação efetora direta da VA na fisiopatogenia da AR, embasou o estudo realizado.

### 6.1 - BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR E FAMILIARES

Alguns estudos têm indicado que a positividade para o FR e anti-CCP pode preceder as manifestações clínicas da AR em alguns anos (SCHELLEKENS *et al.*, 2000; RANTAPAA-DAHLQVIST *et al.*, 2003; NIELEN *et al.*, 2004; KOKKONEN *et al.*, 2011). A pesquisa de autoanticorpos constitui-se no preditor mais potente na obtenção de dados relacionados à gravidade no curso da doença. Nesse contexto, informações a respeito da presença de autoanticorpos podem direcionar o

tratamento em pacientes com artrite não diferenciada e AR (VAN DER HELM-VAN MIL *et al.*, 2007).

O anti-CCP possui elevado valor preditivo, ou seja, pacientes com artrite inicial que ainda não preencheram os critérios do ACR, mas que possuem anti-CCP positivo, apresentam mais chances de virem a desenvolver AR, em especial se os títulos forem elevados (WILLEMZE *et al.*, 2012). De acordo com LINDQVIST *et al.* (2005), sorologia positiva para o anti-CCP e a proteína C reativa é preditiva de danos articulares nas mãos e pés, daqui a 10 anos. O anticorpo anti-MCV tem sido detectado na fase inicial da AR e em sinovites precoces (RAZA *et al.*, 2000), o que também sugere sua presença prévia ao estabelecimento clínico da doença (SEONG-KYU *et al.*, 2013).

A investigação sorológica em familiares de primeiro grau de pacientes com AR representa uma alternativa para se estudar a AR pré-clínica, considerando que este grupo compartilha alguns dos riscos genéticos e ambientais para o desenvolvimento da doença (BARRA *et al.*, 2013). Além de apresentarem aumento na susceptibilidade para AR, os familiares também são mais propensos ao desenvolvimento da doença em sua forma mais grave, sendo a história familiar o principal fator relacionado ao tempo necessário para o surgimento de erosão articular significativa (ROJAS-VILLARRAGA *et al.*, 2009, YOUNG *et al.*, 2013). Pesquisadores que têm investigado familiares não afetados, têm indicado um aumento na frequência da positividade de autoanticorpos neste grupo em relação àquela encontrada em indivíduos do grupo controle (ION-FACSINAY *et al.*, 2008; GOELDNER *et al.*, 2010; ARLESTIG *et al.*, 2012). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram esses dados (26,3% vs 17,4%, respectivamente).

A expressão precoce e elevada de anticorpos relacionados à AR pode estar associada ao aumento do risco para a doença em familiares de pacientes (KIM *et al.*, 2013) e pode ser observada para os quatro anticorpos avaliados nesta pesquisa, em especial para o anti-CCP e FR-IgA (GRÁFICO 4).

Embora a especificidade do FR-IgA não seja tão alta quanto a do anticorpo anti-CCP, algumas pesquisas revelam que o FR-IgA pode ser detectado anos antes de qualquer sintoma da doença, sugerindo um papel primário deste anticorpo na patogênese da AR (RANTAPAA-DAHLQVIST *et al.*, 2003). No presente estudo foi interessante notar que familiares apresentaram quase três vezes mais chance de

serem positivos para o FR-IgA que controles. Além disso, familiares com o fenótipo BF S07 apresentaram quase oito vezes maior probabilidade de serem positivos para o FR-IgA.

Nesse contexto, sendo os familiares o principal grupo de risco para o desenvolvimento da AR, a positividade para o FR-IgA sugere a possibilidade desses indivíduos futuramente preencherem os critérios classificatórios para a doença e ainda apresentarem efetivamente uma forma mais agressiva da mesma, tendo em vista a associação já descrita deste biomarcador em pacientes com erosão óssea (TEITSSON *et al.*, 1984; WITHRINGTON *et al.*, 1984; ATES *et al.*, 2007) e MEA, envolvendo glândulas secretórias e membranas mucosas, principalmente a Síndrome de Sjögren secundária (DUNNE *et al.*, 1979; LUOVIKSSON *et al.*, 1992). Corroborando, dentre os familiares com 2 biomarcadores concomitantes (4%; 8/198), a combinação MCV<sup>+</sup>/FR-IgA<sup>+</sup> foi a predominante (37,5%; 3/8), aliando um marcador de sinovite precoce e outro de gravidade, respectivamente (RAZA *et al.*, 2000; ATES *et al.*, 2007).

O anticorpo anti-CCP apresenta especificidade diagnóstica superior para testes de AR comparado ao FR, porém, ainda não está esclarecido se o antígeno alvo citrulinado é o mais importante no desenvolvimento da doença. Nessa pesquisa, vários familiares foram positivos para o FR e anti-MCV, no entanto, os três familiares que tiveram o diagnóstico confirmado para AR até o momento apresentaram positividade para o anti-CCP, o que refletiu a alta especificidade (99%) e valor preditivo positivo (99%) obtido para esse anticorpo no presente estudo. Corroborando essa afirmação, foi possível observar que somente para o anti-CCP não foi detectada diferença significativa nos títulos de anticorpos entre pacientes e familiares (GRÁFICO 4A), salientando os altos títulos em familiares positivos ainda na fase pré-clínica.

Nesse contexto, Van der Linden *et al.* (2009) demonstraram que a presença concomitante de dois autoanticorpos confere um risco significativamente maior para o desenvolvimento da AR, comparado à presença de apenas um anticorpo. Nos pacientes deste estudo com apenas um marcador, predominou a positividade para o FR ou anti-MCV. Pacientes positivos apenas para o anti-CCP foram raros. Portanto, não se pode excluir a possibilidade que o aumento do risco para AR na presença de dois biomarcadores seja resultante do efeito do anti-CCP (VAN DER LINDEN *et al.*,



2009). Essas informações reforçam os resultados de nossa pesquisa em relação ao anticorpo anti-CCP.

Até o momento, a análise do anti-CCP e outros autoanticorpos demonstrou ainda que o anti-CCP foi o mais comum com maior tempo de doença. Após 10 anos de duração da AR, a positividade do anti-CCP (81,8%) foi maior em relação a do FR-IgM (69,7%), FR-IgA (65,2%) e anti-MCV (69,7%) (APÊNDICE 1).

Os dados obtidos mostram positividade discretamente maior para o FR-IgM (69%) nos pacientes com AR do que para o FR-IgA (65,7%). De forma similar, Vallbracht e colaboradores (2004) encontraram maior frequência do FR-IgM (66,4%) em relação ao FR-IgA (50,8%) e FR-IgG (43,7%) entre os pacientes. Em outro estudo realizado com pacientes de AR da Suécia, os autores reportaram frequências similares para o FR-IgM (79%), FR-IgA (78%) e FR-IgG (68%) (LINDQVIST *et al.*, 2005).

O anticorpo anti-CCP apresentou positividade em 75,7% dos pacientes dessa pesquisa e revelou alta especificidade (99%) quando comparado ao grupo controle (1,1%). Outros autores também observaram que 1% dos indivíduos do controle sadio podem ser positivos para o anti-CCP (VAN VENROOIJ; ZENDMAN; PRUIN, 2006). Por sua vez, pesquisadores na Alemanha (VALLBRACHT *et al.*, 2004) e Suécia (KASTBOM *et al.*, 2004), demonstraram que o anti-CCP foi positivo em 64,4% dos casos de AR. Já na Bélgica (DE RYCKE *et al.*, 2004) encontrou-se sensibilidade de 73,7% e 98,5% de especificidade para o anti-CCP, de forma similar aos resultados na população avaliada.

Em acordo com outros estudos (AMRI *et al.*, 2011), o anti-CCP forneceu a melhor combinação de sensibilidade e especificidade na detecção da AR. Além disso, esse anticorpo citrulinado apresentou valor diagnóstico adicional em alguns pacientes FR negativos. De fato, 31,2% (15/48) dos pacientes negativos tanto para o FR-IgM e FR-IgA foram positivos para o anticorpo anti-CCP. O resultado observado está em acordo com outros relatos nos quais 34,5% dos pacientes negativos para os 3 isótipos do FR apresentaram positividade apenas para o anti-CCP (VALLBRACHT; HELMKE, 2005) e 34,9% dos pacientes negativos para o FR-IgM tiveram positividade para o anti-CCP (ALEXIOU *et al.*, 2007). Por outro lado, Singh e colaboradores (2010) obtiveram positividade apenas para o anti-CCP em 10,86% dos pacientes que eram negativos para os diferentes isótipos de FR.

Anticorpos anti-CCP são marcadores úteis no diagnóstico da AR precoce, especialmente em pacientes soronegativos em relação ao FR, além de auxiliarem na identificação de pacientes que necessitam de tratamentos agressivos para prevenir uma futura doença erosiva (SCHELLEKENS *et al.*, 2000; LINDQVIST *et al.*, 2005; ALEXIOU *et al.*, 2007). Este é considerado o melhor marcador sorológico preditivo de AR, presente na transição da forma pré-clínica assintomática da doença para fase clínica da mesma em familiares de pacientes com AR (KIM *et al.*, 2013). Isto é corroborado pela confirmação até o momento do diagnóstico em 3 familiares anti-CCP positivos.

Estudos clínicos recentes têm sugerido que o anticorpo anti-MCV apresenta valor comparável ao anticorpo anti-CCP no diagnóstico da AR, mostrando inclusive melhor sensibilidade diagnóstica (DEJACO *et al.*, 2006; SVARD *et al.*, 2011). No presente estudo, a prevalência, sensibilidade e especificidade do anticorpo anti-MCV em pacientes com AR foi menor em comparação aos valores obtidos para a anti-CCP. Os resultados observados estão em acordo com outros estudos (MARAINA *et al.*, 2010; AL-SHUKAILI *et al.*, 2012) nos quais o anti-CCP apresentou maior especificidade diagnóstica e valor preditivo positivo que o FR e anti-MCV. Nicaise Roland e colaboradores (2008) encontraram 10% de positividade para o anti-MCV entre indivíduos do grupo controle, muito semelhante aos dados deste estudo (7,6%). Em contrapartida, outro levantamento realizado entre doadores de sangue não detectou positividade para este biomarcador (POULSOM; CHARLES, 2008). Portadores de BF F apresentaram proteção contra a positividade do anti-MCV nos pacientes.

A correlação entre os anticorpos relacionados à AR já tem sido descrita. Poulsom e Charles (2008) identificaram correlação entre o anti-MCV e anti-CCP ( $r=0,59$ ;  $p<0,0001$ ) e FR-IgM ( $r=0,30$ ;  $p=0,038$ ), mas não entre anti-CCP e FR. No entanto, Amri *et al.* (2011) revelaram correlação significativa entre títulos de anti-CCP e FR-IgM ( $k=0,46$ ;  $p <0,001$ ). Agrawal *et al* (2007) reportaram correlação significativa entre níveis de FR-IgA e FR-IgM assim como entre FR-IgA e anti-CCP, da mesma forma que o observado nesse estudo. Porém, os autores não encontraram nenhuma correlação entre o anti-CCP e FR-IgM, ao contrário desse trabalho. Kim *et al* (2013) demonstraram forte correlação entre anti-CCP e anti-MCV em familiares de primeiro grau de pacientes com AR ( $r=0,849$ ;  $p<0,0001$ ). No

presente estudo houve correlação significativa entre todos os quatro autoanticorpos avaliados em pacientes com AR ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, uma correlação mais forte foi observada entre FR-IgM e FR-IgA ( $r = 0,71$ ) e entre anti-CCP e anti-MCV ( $r = 0,73$ ). É interessante notar que as maiores correlações ocorreram entre anticorpos direcionados a epítomos comuns (TABELA 4).

A influência do gênero feminino tem sido frequentemente descrita na AR e corrobora a maior frequência de pacientes mulheres reportada neste estudo, com uma alta proporção do gênero feminino/masculino (5,6:1) quando comparado a dados globais (aproximadamente 3:1). Dentre os pacientes norte-americanos com AR, os masculinos eram mais propensos a apresentarem soropositividade para os anticorpos FR e anti-CCP (JAWAHEER *et al.*, 2006). De forma interessante, houve maior frequência de pacientes brasileiros do gênero masculino com 4 biomarcadores concomitantes, comparado à frequência encontrada em mulheres.

BARRA *et al* (2013) encontraram resultados semelhantes aos observados neste estudo, em que a maioria dos pacientes com AR foi positiva para 4 biomarcadores simultaneamente, enquanto no grupo de familiares predominou apenas um anticorpo positivo. Isso sugere a possibilidade do espalhamento de epítomos e a elevação nos níveis de anticorpos previamente ao estabelecimento do cenário clínico da AR (VAN DER WOUDE *et al.*, 2010). O predomínio de apenas um biomarcador nos familiares e no grupo controle deste estudo é responsável pelo aumento na positividade total, em ambos os grupos (26,3% e 17,4%, respectivamente).

A ausência de associação entre o número de biomarcadores em pacientes com AR e idade de início da doença, duração da doença e classe funcional serve de alerta em relação aos familiares sorologicamente positivos, uma vez que o risco potencial desses indivíduos não se altera mesmo com apenas um biomarcador positivo. A alta especificidade de cada anticorpo para AR, observada nesse estudo, respalda essa idéia.

A condição de fumante é bem conhecida como um fator de risco para soropositividade na AR, especialmente para o FR e anti-CCP (KLARESKOG *et al.*, 2006). Não houve associação entre a exposição ao tabaco e o número de biomarcadores em pacientes, embora tenha sido sugerido que o fumo influencie na gravidade da AR (MATTEY *et al.*, 2002; PAPADOPOULOS *et al.*, 2005). Todavia,

sabe-se que o tabagismo só é preditivo da AR em indivíduos HLA-SE (VAN DER HELM-VAN MIL *et al.* 2007; LUNDSTRÖM *et al.*, 2009).

A interação de fatores genéticos e ambientais em pacientes com AR, resulta em uma cascata de reações imunes que conduzem ao desenvolvimento de manifestações extra-articulares e co-morbidades (GIBOFSKY, 2012). A alta positividade de anticorpos está relacionada à presença de MEA, como evidenciada entre os pacientes desta pesquisa, levando-nos a sugerir que os indivíduos sorologicamente negativos (nenhum biomarcador presente) estariam protegidos de apresentar pior prognóstico relacionado às MEA ( $p=0,0179$ ;  $OR=0,283$ ;  $IC=0,09-0,86$ ; TABELA 12). Pacientes com BF\*S07 estão quase 7 vezes mais predispostos a desenvolver MEA ( $p=0,021$ ;  $OR=6,62$ ;  $IC=1,33-32,95$ ), conforme demonstrado nos resultados obtidos nesta pesquisa, discutidos no item 6.2.

A prevalência de MEA encontrada entre os pacientes brasileiros foi maior (34,8%; 69/198) que a observada em estudo com pacientes espanhóis e asiáticos (21,5%) (RICHMAN *et al.*, 2013). A manifestação mais comum, a Síndrome de Sjögren Secundária (30,2%), também foi observada com maior frequência em estudos da Itália e Espanha (17,5% e 55%, respectivamente) (MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 1990; CIMMINO *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos entre os familiares nessa pesquisa estão em acordo com vários outros estudos, indicando a importância do diagnóstico e tratamento precoce da AR, visando reverter a morbidade nesses indivíduos (ARLESTIG *et al.*, 2011; BARRA *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2013). A alta positividade de biomarcadores (26,3%) encontrada neste grupo confirma a utilidade da triagem sorológica nesses indivíduos, que são considerados como o grupo de maior risco para o desenvolvimento da doença.

Familiares de primeiro grau que demonstram reatividade a uma ampla gama de autoanticorpos podem ter articulações mais gravemente afetadas (YOUNG *et al.*, 2013), conforme revelado pela presença significativa de artralgia em indivíduos positivos para qualquer um dos biomarcadores avaliados neste estudo (concomitantes ou isolados). Young *et al.* (2013) já haviam alertado para o fato de que o anti-CCP está associado a processos inflamatório pré-clínicos. Corroborando, alguns desses familiares já estão progredindo para AR, tendo sido confirmado o diagnóstico em três desses, até o momento.

Os familiares de pacientes com AR apresentaram, de forma interessante, uma alta positividade para o FR-IgA (14,6%). Este foi o autoanticorpo mais presente nesse grupo, embora a positividade obtida ainda seja menor que a encontrada em estudos no Canadá (21,6%; IOAN-FACSINAY *et al.*, 2008) e no Norte da Suécia (22,3%; ARLESTIG *et al.*, 2012), porém maior que a revelada entre familiares de pacientes com AR dos EUA (3,8%; KOLFENBACH *et al.*, 2009).

Assim como em outros estudos (ARLESTIG *et al.*, 2012), um aspecto interessante entre os familiares dessa pesquisa foi o aumento relativo de anticorpos reumatoides das classes IgA (14,6%) e IgM (8,1%) comparados aos anticorpos citrulinados anti-CCP e anti-MCV da classe IgG (5,6% e 8,1%, respectivamente), evidenciando uma distribuição diferente de positividade entre os familiares e os pacientes, sendo os anticorpos da classe IgA menos prevalentes nesse último grupo. Barra e colaboradores (2013) também observaram diferença no perfil de isótipos de ACPA, predominando anticorpos da classe IgG em pacientes e IgA em familiares. Estes autores ressaltam o envolvimento do isótipo IgA com a imunidade da mucosa, e portanto, maior risco para aqueles que são fumantes, que apresentam gengivites ocasionadas por *Porphyromonas gingivalis* (QUIRKE *et al.*, 2013), e de forma geral, infecções por *Proteus mirabilis*, retrovírus e vírus Epstein-Barr (LOSSIUS *et al.*, 2012; RASHID, EBRINGER, 2012).

Diante da análise desses quatro biomarcadores nas amostras de pacientes e familiares do Sul do Brasil, sugere-se que, apesar de haver o predomínio de apenas um biomarcador positivo entre os familiares, isto não exclui esses indivíduos de um maior risco para o desenvolvimento da doença ou para a soroconversão para 2, 3 ou até mesmo mais biomarcadores característicos da AR, independentemente da idade que venha a ocorrer o diagnóstico, tempo de duração da doença e/ou da classe funcional desenvolvida. Apesar da maioria desses indivíduos não apresentarem a doença clínica no momento da pesquisa, eles devem ser considerados uma população de risco na qual a sorologia positiva para AR, exposições epidemiológicas, fatores genéticos e possíveis etiologias para a doença devem ser considerados para acompanhamento.

## 6.2 - VARIABILIDADE ALOTÍPICA DE BF E BIOMARCADORES EM PACIENTES COM AR E FAMILIARES

Diferentes teorias têm sido propostas para explicar os mecanismos patogênicos da AR, baseadas principalmente nos aspectos genéticos, ambientais e hormonais. A predisposição genética foi avaliada extensivamente no decorrer dos últimos anos, encontrando-se uma frequência aumentada da doença em familiares de pacientes com AR soropositivos (ROJAS-VILLARRAGA *et al.*, 2009; SEONG-KYU *et al.*, 2013; GOELDNER *et al.*, 2014b).

A observação de que antígenos HLA-DR4 estão intimamente relacionados com o desenvolvimento da AR em muitas populações, inclusive nos familiares, reforça a importância do componente genético da doença (MacGREGOR *et al.*, 2000; HUIZINGA *et al.*, 2005). No entanto, o HLA-DR4 é encontrado geralmente em apenas 60 a 80% dos pacientes eurodescendentes com AR, existindo diferentes hipóteses para que esse índice não atinja 100%. A primeira delas é que existem diferentes alelos alternativos de susceptibilidade à AR que não o HLA-DR4, tendo em vista a já relatada associação de HLA-DR1 com a doença (SELDIN *et al.*, 1999; TURESSON *et al.*, 2005; FATHI *et al.* 2008). Na segunda hipótese, propõe-se que o HLA-DR4 não é o gene que predispõe à AR, mas que este, em desequilíbrio de ligação com outros genes, pode provocar o desenvolvimento da doença (FIELDER *et al.*, 1989; ZANELLI; BREEDVELD; DE VRIES, 2000).

Alelos de genes relacionados ao SC tais como C2, C4 e BF, em estreita proximidade ao HLA-DR no cromossomo 6, poderiam conduzir a alterações nos mecanismos imunológicos efetores e aumentar a susceptibilidade a determinadas doenças (RITTNER; BERTRAMS, 1981; SCHOLL *et al.*, 2008; WU, *et al.*, 2011). Investigações sobre proteínas do complemento em pacientes com AR e populações de risco merecem estudos mais aprofundados, considerando que polimorfismos do SC podem ser úteis como marcadores específicos de haplótipos associados a características inerentes da doença.

Mesmo com os avanços que possibilitam a pesquisa de alelos do complemento ao nível molecular, estudos envolvendo polimorfismos de BF são predominantemente realizados por alotipagem proteica. De acordo com

PRODINGER *et al.* (1999) a fenotipagem tem a vantagem de confirmar, dependendo do método aplicado, a presença e até mesmo a atividade funcional da proteína. Já em estudos envolvendo genotipagem, não é possível identificar a atividade da proteína e nem a presença de alelos nulos. Neste estudo, em que a via alternativa e o BF têm papel fundamental na patogenia da doença e no processo de formação da lesão, a confirmação da expressão da proteína e a caracterização das diferentes variantes tornam-se fundamentais na análise de associação destas, com a susceptibilidade e a gravidade da doença.

A associação de alótipos de C4, BF e C3 com AR já foi relatada por alguns autores em diferentes populações (FAHRUD, ANANTHAKRISHNAN, WATER, 1972; O'NEIL *et al.*, 1982; DYER *et al.*, 1985). No entanto, a grande miscigenação da população brasileira confere um caráter inédito à investigação das variantes alotípicas de BF tanto nos pacientes com AR do sul do Brasil, como nos seus familiares. A avaliação da ocorrência de associação entre essas variantes com o desenvolvimento da doença, bem como com aspectos clínicos importantes como classe funcional, presença de MEA e positividade para os diferentes autoanticorpos artritogênicos, entre outros, é de fundamental relevância científica.

As frequências alotípicas de BF encontradas no grupo controle desse estudo (TABELA 17) encontram-se de acordo com aquelas observadas na literatura em relação à população eurodescendente (ALPER; BOENICH; WATSON, 1972) e também são concordantes com os dados obtidos por Messias *et al.* (1994) em um estudo realizado com 225 indivíduos sadios de uma capital de estado do sul do Brasil.

Os resultados dessa pesquisa permitiram demonstrar que tanto a distribuição das frequências dos fenótipos como dos portadores de alótipos de BF nos pacientes com AR e familiares não diferiram dos controles (TABELAS 15 e 16). Assim como Fielder *et al.* (1989), observou-se uma diminuição na frequência alotípica de BF S e um aumento na de BF F ao se comparar familiares e controles, contudo sem atingir significância estatística. Em contrapartida, Dahlquist *et al.* (1985) e Dyer *et al.* (1985) observaram diminuição do fenótipo BF SF e aumento do fenótipo BF SS em pacientes suecos e ingleses, respectivamente, sugerindo que resultados

discrepantes na associação de marcadores genéticos para AR podem surgir devido a heterogeneidade genética nos grupos de pacientes.

Nessa pesquisa, a distribuição dos fenótipos foi muito semelhante entre os grupos avaliados, predominando o BF S, seguido do BF SF, BF F, BF S07. As variantes raras comportaram-se de forma semelhante. Watzko e Messias (1994), em um estudo com 61 pacientes com AR soropositivos, da mesma área geográfica, obtiveram distribuição de fenótipos e alótipos de BF discretamente diferentes dos encontrados no presente estudo, porém o predomínio dos fenótipos BF S e BF SF coincidiu no grupo de pacientes e controles, havendo ausência de significância na comparação entre os mesmos. Picceli (2013), em um estudo similar, porém com pacientes com lupus eritematoso sistêmico (LES) (N=191) dessa área geográfica, não obteve associação dos alótipos de BF com o desenvolvimento da doença ao comparar pacientes e indivíduos saudáveis.

Ao se realizar a comparação da distribuição dos fenótipos de BF entre pacientes e familiares detectou-se uma diminuição significativa de BF S nos familiares ( $p=0,0391$ ), porém, a correção por regressão logística para o gênero, idade e tabagismo, não confirmou esta significância ( $p=0,109$ ; OR=1,49; 95%IC=0,92-2,42). Em contrapartida, apesar de não subdividir os pacientes pela presença de história familiar ou gênero, outros pesquisadores demonstraram diminuição de BF SF e aumento de BF S em um grupo de 353 pacientes com AR em relação aos controles saudáveis, contudo, não se pode afirmar se esta associação está ligada a algum parâmetro demográfico e/ou clínico ou com a doença em si (DYER *et al.*, 1984; DYER *et al.*, 1985).

Dessa forma, os dados obtidos na tipagem de BF nos 180 pacientes com AR, nos 198 familiares e nos 98 controles da população do sul do Brasil permitem sugerir ausência de relação entre as variantes de BF e o desenvolvimento da doença nos indivíduos em estudo.

Pesquisas revelaram que a AR é rara em homens antes dos 45 anos, no entanto, essa incidência aumenta com a idade, alcançando valores próximos das mulheres (WILDER, 1996; JAWAHEER *et al.*, 2006). Sugere-se que hormônios femininos estejam envolvidos no cenário da doença, ao passo que os androgênios possuem um papel supressor em relação ao desenvolvimento da AR (Da SILVA,



HALL, 1992). O gênero feminino estaria consistentemente implicado como um fator de risco para o surgimento dessa doença (SYMMONS, 2002).

Na AR familiar no entanto, o histórico de familiares de primeiro grau de pacientes masculinos afetados é considerado um risco para a doença (KWOH *et al.*, 1996), além disso, fatores relacionados ao gênero também podem influenciar na penetrância dos genótipos *SE* HLA-DRB1 (MEYER *et al.*, 1996), como no caso do genótipo DRB1\*0401/0404, por exemplo, está associado com a forma erosiva da doença (GORMAN *et al.*, 2004) e é mais frequente entre os homens, cuja doença inicia antes dos 30 anos (MacGREGOR *et al.*, 1995).

Embora haja predomínio de mulheres com AR (5,6:1), a distribuição dos fenótipos e alótipos de BF foi homogênea entre os gêneros, nos diferentes grupos avaliados (TABELA 18; APÊNDICE 5A). Dahlquist *et al.* (1985) encontraram uma frequência menor de BF SF em pacientes masculinos com história familiar de poliartrite. Watzko e Messias (1994), ao avaliarem pacientes com AR da mesma área geográfica que a nossa, não fizeram referências sobre associação entre BF e o gênero dos pacientes, não sendo possível comparar os resultados.

Destaca-se em nosso estudo o aumento significativo da presença de 4 biomarcadores concomitantes nos homens (65,6%; 21/32;  $p=0,0206$ ), no entanto, a análise específica do BF nesse grupo revelou que a maioria dos indivíduos possuíam o fenótipo BF SS (9/16), seguido por BF SF (5/16).

Não houve associação entre os fenótipos e alótipos de BF com dados clínicos e sorológicos das mulheres com AR.

Sendo assim, no presente estudo, os dados obtidos permitem sugerir ausência de relação entre as variantes de BF e o gênero nos pacientes com AR do sul do Brasil e seus familiares. De forma semelhante, PICCELI (2013) não encontrou associação em pacientes com LES da mesma área geográfica.

Ao se subdividir os pacientes pela idade de início da doença, não foi possível estabelecer uma associação entre as variantes de BF e a maior ou menor precocidade na manifestação da AR. A identificação de uma variante alotípica de BF que sugerisse susceptibilidade à doença poderia ser de real contribuição na detecção precoce da AR, porém os resultados do presente estudo não evidenciaram essa associação (TABELA 19).

Assim como nesse estudo, outros pesquisadores não encontraram associação entre os fenótipos e alótipos de BF com a classe funcional da doença, nem mesmo quando subdividiram os pacientes com AR em dois grupos, um com características mais leves e outro de progressão em relação aos aspectos clínicos da doença (Van ZEBEN *et al.*, 1992; PAIMELA *et al.*, 1996)

Por outro lado, Dahlquist *et al* (1985) relataram associações significativas de BF S tanto com a forma mais grave da doença (classes III e IV), quanto com a presença de altos títulos do FR. Nesse seguimento, Watzco e Messias (1994) observaram diminuição significativa de BF SF em pacientes brasileiros com AR classe funcional III e IV, sugerindo um papel deste fenótipo na proteção ao desenvolvimento de formas clínicas mais incapacitantes da doença. De forma similar, também foi detectado aumento de BF S e diminuição de BF SF nos pacientes em estudo que apresentaram classe III/IV da doença (68,2% e 13,6%, respectivamente; TABELA 20), embora sem atingir significância estatística, assim como frequência mais elevada de 4 biomarcadores concomitantes entre esses pacientes classe III/IV (59,3%; 16/27).

Os pacientes que fizeram parte do presente estudo recebem o tratamento adequado e são acompanhados periodicamente evitando a evolução dos mesmos para classes funcionais mais debilitantes da doença (classes III e IV), portanto, a ausência de significância estatística na análise das variantes de BF em relação à classe funcional da AR nessa pesquisa pode ser compreendida, tendo em vista que há alguns anos não se dispunha dos medicamentos empregados atualmente.

Diante do exposto, é possível observar que mesmo em pesquisas realizadas com pacientes da mesma nacionalidade, e de área geográfica próxima, podem ocorrer discrepâncias nos resultados obtidos, decorrentes possivelmente dos critérios de seleção e do número das amostras avaliadas.

Estudos atualizados que relacionam a VA do SC com AR e que avaliam a presença e/ou concentrações de componentes desta via, como BF e fator H, em relação a aspectos clínicos, sorológicos e experimentais são escassos na literatura (FRIESE *et al.*, 2000; BANDA *et al.*, 2006; AREND *et al.*, 2013).

No entanto, a participação da VA na artrite já está bem estabelecida, sendo demonstrado mais recentemente que a ativação patogênica dessa via exerce um papel deletério na artrite induzida por colágeno (HIETALA *et al.*, 2002). Proteínas

como a COMP-C3b, que ativam o SC pela VA, encontram-se em concentrações elevadas em diversas doenças reumatológicas. Além disso, seus níveis estão correlacionados com os de proteínas inflamatórias na AR (HAPPONEN *et al.*, 2012). A ativação da VA também pode ocorrer nas articulações através de imunocomplexos aderidos à cartilagem, assim como pela produção local de proteínas pelos adipócitos e por sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (AREND *et al.*, 2013).

Os dados obtidos no presente estudo tornam possível sugerir uma influência do polimorfismo de BF nas consequências clínicas da doença, mais especificamente nas MEA. O aumento na frequência dos fenótipos BF SS07 e BF FS07 ( $p=0,0487$ ) em pacientes com MEA, bem como a maior prevalência de portadores do alótipo BF\*S07 ( $p=0,021$ ; OR:6,62; IC:1,33-32,95) nesse grupo de pacientes, permitem sugerir um papel dessas variantes/alótipo na maior susceptibilidade às MEA em pacientes com AR, mais especificamente à Síndrome de Sjögren ( $p=0,0301$ ). Nesse sentido, dentre os 7 pacientes com MEA que compartilham o alótipo BF\*S07, 4 deles apresentam entre 3 e 4 biomarcadores positivos, reforçando o pior prognóstico associado a esse alótipo. Corroborando, o alótipo BF\*S07 não foi identificado entre os pacientes soronegativos sem MEA ( $N=23$ ), ao passo que entre os soronegativos com MEA ( $N=4$ ) um dos pacientes apresentou o fenótipo BF SS07. É possível que o pequeno número de pacientes com outras MEA, como nódulos reumatoides (9,4%; 15/160) e fibrose pulmonar (8,9%; 13/146), não tenha possibilitado associação semelhante.

Familiares BF FS07 são quase 8 vezes mais propensos a apresentarem positividade para o FR-IgA ( $p=0,018$ ; OR:7,78; IC:1,43-42,46; TABELA 29), que se manteve para o alótipo BF\*S07, apesar de não significativo (APÊNDICE 5H). A associação já descrita na literatura entre a presença do FR-IgA e a ocorrência de MEA (JÓNSSON *et al.*, 1995), assim como de uma maior predisposição ao desenvolvimento da AR na sua forma erosiva (ATES *et al.*, 2007), permitem sugerir a existência de uma associação de BF FS07 como um fator de risco para familiares de pacientes com AR, tanto no que se refere a positividade de biomarcadores, mais especificamente FR-IgA (OR:7,78), como também em relação aos parâmetros clínicos, considerando a significativa associação da variante S07 com a ocorrência de MEA em pacientes com AR (OR:6,62).

A análise conjunta do polimorfismo de BF e positividade de biomarcadores são de interesse científico tendo em vista o envolvimento da VA na etiopatogênese da doença e a observação que imunocomplexos formados tendem a ligar-se aos tecidos colagenosos e à cartilagem, podendo ocorrer a ativação do complemento *in situ*, com consequente lesão tecidual através do complexo lítico de membrana (C5b-9) e da liberação de enzimas lisossomais de células inflamatórias (COOKE; JASIN, 1972; TROUW *et al.*, 2009; CARROLL, SIM; 2011).

Assim como já demonstrado que o anticorpo anti-CCP é capaz de ativar a VA de forma suficiente a desencadear a doença (TROUW *et al.*, 2009), é possível supor que outros biomarcadores, tais como o FR-IgA, que estejam depositados em cartilagens ou tecidos colagenosos, apresentem capacidade para ativarem a VA. Isso pode ocorrer por uma ligação mais efetiva com a properdina ou com o C3b inicial, exercendo diferentes efeitos na formação da C3 convertase em indivíduos que são portadores de determinados alótipos de BF, tais como BF \*S07 (FIGURA 14).

Sugere-se que pacientes/familiares com esta variante de BF, e concomitantemente positivos para o FR-IgA, possam provocar uma liberação mais eficiente de componentes pró-inflamatórios do SC, tais como C3a e C5a, ocasionando inicialmente uma sinovite pelo intenso afluxo de células inflamatórias na sinóvia. Com o decorrer do tempo, a contínua inflamação do tecido sinovial, alimentada pela alça de amplificação decorrente da ativação constante da VA, assim como pela capacidade do FR em perpetuar a doença através da formação de imunocomplexos e fixação do complemento, contribuem na formação do tecido invasivo de caráter proliferativo denominado *pannus*, exacerbando a condição patológica com lesão celular e consequente manifestações extra-articulares pela expansão do processo.

Essa hipótese ressalta o valor dos estudos de associação genética entre os pacientes com AR e seus familiares, pois além destes apresentarem compartilhamentos genéticos, de forma geral são expostos a fatores ambientais semelhantes e, na maioria das vezes, apresentam uma condição sócio-econômica parecida, além de frequentemente habitarem área geográfica similar.

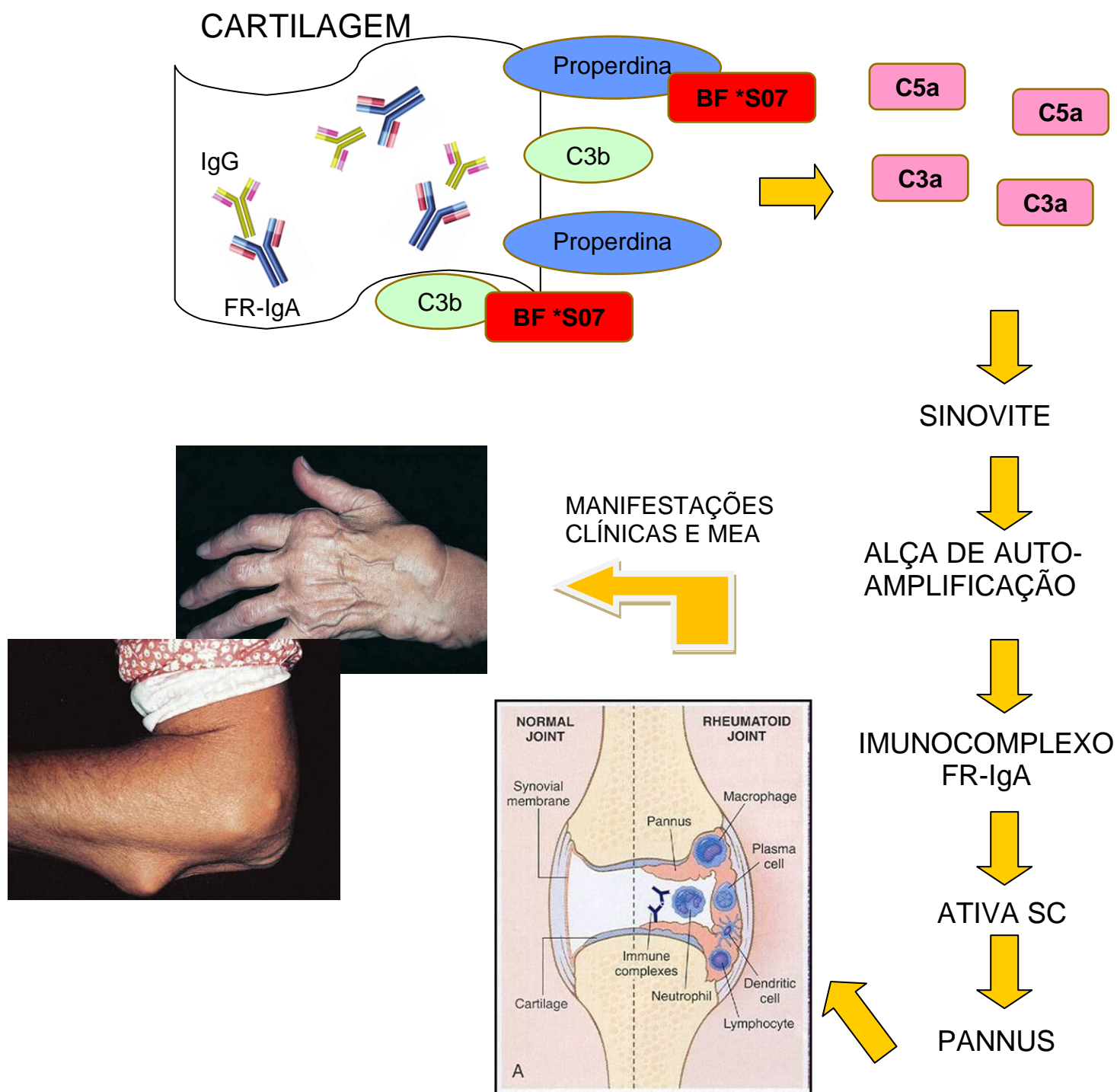


FIGURA 14 – HIPÓTESE DO MECANISMO IMUNOLÓGICO PARA ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO POR COMPLEXOS IMUNES EM INDIVÍDUOS COM A VARIANTE ALOTÍPICA BF \*S07

FONTE: O Autor (2014)

NOTA: Para mais explicações, vide texto.

A análise da distribuição das variantes de BF em relação aos autoanticorpos encontrados na AR, com os resultados significantes demonstrados, contribui na identificação de marcadores relacionados à susceptibilidade ou proteção ao aparecimento dos mesmos nos pacientes e/ou familiares, com consequente reflexo nas manifestações clínicas e gravidade da doença.

Warlow *et al* (1985; 1988) demonstraram associação entre o fenótipo BF SF e a presença de autoanticorpos em pacientes com AR. Watzco e Messias (1994) estudaram pacientes com AR, positivos para o FR-IgM, no entanto, o fenótipo BF SF esteve presente de modo equivalente nos pacientes e controles.

Não foi caracterizada diferença significativa na distribuição dos fenótipos e alótipos de BF em relação à positividade total dos anticorpos anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA nos grupos de pacientes e familiares desse estudo.

Por sua vez, a análise dos fenótipos de BF comparando pacientes positivos vs negativos para um mesmo biomarcador (TABELA 26), ao revelar para BF F um papel de proteção à positividade para o anti-MCV ( $p=0,021$ ; OR:0,22; IC:0,06-0,80), corroborou o caráter protetor também verificado em pacientes com esse mesmo fenótipo (BF F), a possuírem menor número de biomarcadores na comparação de 4 marcadores concomitantes vs 3 marcadores ( $p=0,044$ ; OR:0,18; IC:0,03-0,96; TABELA 25). Em contrapartida, a associação positiva do alótipo BF\*S com a presença de anti-MCV nos pacientes ( $p=0,017$ ; OR:3,77; IC:1,27-11,17), vem ao encontro do papel da VA na fisiopatogenia da AR, inclusive a nível dos biomarcadores sorológicos, reforçando a associação já discutida de FR-IgA com BF FS07 em familiares, e permitindo supor que o anti-MCV possa desempenhar um papel semelhante ao anti-CCP na ativação da via alternativa (TROUW *et al.*, 2009). Corroboram tal suposição estudos recentes enfatizando a detecção do anti-MCV na fase recente da AR e em sinovites precoces, bem como previamente ao estabelecimento clínico da doença (RAZA *et al.*, 2000; SEONG-KYU *et al.*, 2013).

Em 1987, Lanchbury, Pal e Papiha, ao estudarem 225 pacientes ingleses com AR, mostraram aumento significativo de BF SS e diminuição de BF SF em pacientes positivos para o FR e negativos para o fator antinuclear (FAN), já indicando na época a consistência de associações fenotípicas em pacientes com sorologia positiva. Diante dos achados, pode-se sugerir que pacientes com biomarcadores positivos são geneticamente heterogêneos em relação ao polimorfismo de BF e que

nesse caso, a presença do alótipo BF\*S entre os mesmos pode indicar um marcador de maior gravidade da doença, tendo em vista que a positividade para um maior número de autoanticorpos artritogênicos está relacionada a um pior prognóstico para a doença.

Ao se estudar familiares, espera-se um alto índice de fatores genéticos contribuindo à susceptibilidade à doença. Na AR, parece que tais genes não são totalmente penetrantes, pois um número significativo de familiares herdaram esses genes, mas não manifestam necessariamente a condição de doença. Portanto, a descoberta de marcadores genéticos que estejam mais frequentes tanto em familiares não afetados quanto naqueles afetados não é inconsistente com a ideia de que esse marcador pode contribuir em algum momento para o desenvolvimento da doença, ou, que o mesmo pode ser um marcador para um haplótipo ligado ao gene de susceptibilidade (FIELDER *et al.*, 1989). Sabe-se que, somente aquele indivíduo que atende os critérios classificatórios (ALETAHA, 2010) é considerado como um paciente com AR. No entanto, dentro de várias famílias se encontram indivíduos que apresentam polimorfismos de proteínas que estão associados à AR, sorologia positiva, e até mesmo características clínicas individuais relacionadas à doença, tal como a artralgia. Nesse contexto, somente a inclusão desses grupos de risco nos estudos, assim como um rigoroso acompanhamento clínico-sorológico dos mesmos, vai esclarecer gradualmente o real significado dos achados.

No presente estudo, não foi observada associação entre a presença de artralgia nos familiares com as variantes de BF. No entanto, dentre os familiares com artralgia, aproximadamente 45,4% (10/22) são positivos para pelo menos um biomarcador, estando a artralgia associada significativamente à positividade de todos os biomarcadores em estudo. De acordo com um estudo recente realizado com a população alemã, o risco de desenvolver AR em um período de dois anos é estimado em 40% entre indivíduos que relatam artralgia e que são positivos para ambos os marcadores, FR e ACPA's (BOS *et al.*, 2010).

Nesse estudo constatou-se a importância da análise de distribuição das variantes fenotípicas de BF em relação aos autoanticorpos encontrados na AR nas amostras de pacientes, mas principalmente da inclusão dos familiares nessa investigação. Através da identificação de marcadores relacionados à susceptibilidade ou proteção ao aparecimento de autoanticorpos, com conseqüente

reflexo nas manifestações clínicas e gravidade da doença, foi possível verificar que entre os familiares já existem alguns indivíduos, que por apresentarem compartilhamentos genéticos e, de forma geral serem expostos a fatores ambientais semelhantes, são mais propensos ao desenvolvimento da doença.

Além dos três familiares que já preencheram os critérios de diagnóstico para AR, tem-se mais oito indivíduos com sorologia positiva e que apresentam artralgia, sendo que seis deles compartilham o alótipo BF \*S, o qual já foi associado no grupo de pacientes como um fator de risco ( $OR=3,77$ ) para o aparecimento do anti-MCV, sugerindo a participação desse autoanticorpo na ativação da VA, assim como o anti-CCP, e desencadeando um processo inflamatório condizente com a artralgia relatada pelos mesmo. Dois dos familiares com artralgia já apresentam positividade para 4 biomarcadores simultaneamente, fato relatado na literatura como pior prognóstico e gravidade da doença, assim como a positividade para o FR-IgA, que foi verificada em 5 desses familiares (5/8) e que está associada à presença de erosão óssea e MEA. Portanto, os achados obtidos reforçam o valor de estudos clínico-laboratoriais em familiares de pacientes com AR, considerando ainda que a história familiar é a principal contribuinte para o surgimento de erosão articular.

Torna-se evidente, neste estudo, a grande heterogeneidade de fatores que podem influir tanto no aparecimento como na expressão clínica da doença mostrando que, talvez, sob o título de artrite reumatoide se encontrem diferentes formas da doença. O entendimento dessas variações é fundamental para que, no futuro, seja possível construir um plano terapêutico individualizado para cada paciente que venha atender as suas aspirações em termos de sobrevida e de melhoria da qualidade de vida.



## 7 - CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo levou às seguintes conclusões:

A positividade dos biomarcadores em estudo (anti-CCP, anti-MCV, FR-IgM e FR-IgA) foi significativamente elevada nos pacientes com AR em relação aos familiares e controles, prevalecendo o anti-CCP entre os pacientes e o FR-IgA entre os familiares.

A ausência de diferença significativa nos títulos dos anticorpos anti-CCP em pacientes com AR e familiares positivos destaca o papel deste biomarcador na fase pré-clínica da doença. A maior especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do mesmo dentre os biomarcadores investigados respalda o valor dos achados.

O predomínio de positividade concomitante para quatro biomarcadores entre os pacientes com AR, e de apenas um marcador em familiares, aliado à ausência de relação entre o número de biomarcadores com a idade de início da doença, classe funcional e tabagismo, reforçam os familiares como grupo de risco em potencial para a AR, mesmo em presença de um só anticorpo positivo.

A positividade concomitante para um maior número de biomarcadores se mostrou associada à presença de manifestações extra-articulares em pacientes com AR, mais especificamente à Síndrome de Sjögren, enquanto a ausência de biomarcadores foi associada com proteção significativa para as mesmas.

Artralgia foi significativamente associada à positividade para qualquer um dos biomarcadores nos familiares e corrobora a participação dos mesmos no processo inflamatório pré-clínico da AR.

A distribuição dos fenótipos e de portadores de alótipos de BF não foi associada com a AR, sugerindo ausência de relação entre estes e o desenvolvimento da doença nos pacientes avaliados.

Não houve diferença significativa na distribuição das variantes fenotípicas de BF nos pacientes com AR em relação ao gênero, idade de início e classe funcional da doença, assim como nos familiares não ocorreu relação com artralgia.

O fenótipo BF FS07 se associou significativamente às MEA nos pacientes com AR, ficando caracterizado o alótipo BF\*S07 como fator de risco para o desenvolvimento das mesmas. Entre as MEA apenas a Síndrome de Sjögren manteve significância na associação com BF FS07.

O fenótipo BF F foi negativamente associado com a positividade para 4 biomarcadores concomitantes em pacientes com AR, especificamente com a presença de anti-MCV, sugerindo um papel de proteção em relação à positividade para esse anticorpo.

O alótipo BF\*S apresentou-se como um fator de risco para presença de anti-MCV em pacientes com AR, estando com frequência significativamente elevada entre pacientes positivos para esse autoanticorpo.

O aumento significativo na positividade de FR-IgA nos familiares com BF FS07, bem como a associação deste fenótipo e do alótipo BF\*S07 com as MEA nos pacientes, sugerem esta variante alotípica de BF como um marcador de mau prognóstico na artrite reumatoide.

## REFERÊNCIAS

ABBAL, M. *et al.* Two subtypes of BfF by isoelectrofocusing: Differential linkage to other HLA markers. **Hum Genet.**, v. 69, p. 181 – 183, 1985.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Mecanismos Efetores da Resposta Imune. In:\_\_\_\_**Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 – 2ª Tiragem. p. 329-346.

AGGARWAL, A. *et al.* Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 39, n. 2, p. 189-192, 2000.

AGRAWAL, S.; MISRA, R.; AGGARWAL, A. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA. **Clin Rheumatol.**, v. 26, p. 201-204, 2007.

AHMED, M. M.; OBAID, K. A.; MOHAMMED, S. H. Evaluation of the rheumatoid factors of the IgG, IgM and IgA isotypes as prognostic parameters for rheumatoid arthritis among Iraqi patients. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 53, n. 3, p. 433-438, 2010.

ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 47, n. 3, p. 180-187, 2007.

ALETAHA, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria : an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, n. 9, p. 1580-1588, 2010.

ALEXIOU, I. *et al.* Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Greek patients with rheumatoid arthritis. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 20, n. 8, p. 37, 2007.

ALLANNIC, H. *et al.* Factor B (Bf) and glyoxalase genes in insulin-dependet diabetes mellitus. **Diabete Metab.**, v. 11, n. 1, p. 22-26, 1985.

ALPER, C. A.; BOENICH, T.; WATSON, L. Genetic polymorphism in human glycine-rich-beta-glicoprotein. **J Exp Med.**, v. 135, n. 1, p. 68-80, 1972.

AL-SHUKAILI, A. *et al.* Evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in Omani patients with rheumatoid arthritis. **Int J Rheumatol.**, p.1-5, 2012.

AMRI, M. *et al.* Anti-CCP antibodies, rheumatoid gactors and anti-keratin antibodies: clinical value in established rheumatoid arthritis. **Tunis Med.**, v. 89, p. 231-235, 2011.

AREND, W. P. *et al.* Roles of adipocytes and fibroblasts in activation of the alternative pathway of complement in inflammatoryarthritis in mice. **J Immunol.**, v. 190, n. 12, p. 6423-6433, 2013.

ARLESTIG, L. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptides of IgG, IgA and IgM isotype and rheumatoid factor of IgM and IgA isotype afre increased in unaffected members of multicase rheumatoid arthritis families from northern Sweden. **Ann Rheum Dis.** v., 71, p. 825-829, 2012.

ARNETT, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. 315-24, 1988.

ARNOLD, J. N. *et al.* Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. **Adv Exp Med Biol.** v. 564, p. 37-43, 2005.

ATES, A. *et al.* Effects of rheumatoid factor isotypes on disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis: a comparative study. **Clin Rheumatol.**, v. 26, n. 4, p. 538-545, 2007.

ATKINSON, J. P. Complement system. In: HARRIS, Jr E. D.; BUDD, R. C.; FIRESTEIN, G. S. *et al.* Kelley's Textbook of Rheumatology. Ed Elsevier, Philadelphia. 2005. p. 342-355.

BALI, D. *et al.* Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families. **Genes Immun.**, v. 1, n. 1, p. 28-36, 1999.

BALLANTI, E. *et al.* Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. **Autoimmun Rev.**, v. 10, n. 10, p. 617-623, 2011.

BANDA, N. K. *et al.* Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. **J Immunol.**, v. 177, n. 3, p. 1904-1912, 2006.

BANG, H. *et al.* Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 56, p. 2503-2511, 2007.

BARBIERI, R.; CHIEREGHIN, A. O reumatologista revisita a : Síndrome de Sjögren. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.10, n. 3, 2009.

BARRA, L. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies in unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum.**, v. 65, p.1439-1447, 2013.

BARTOK, B; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunol Rev.**, v. 233, p. 233-255, 2010.

BARTOLONI, E. *et al.* Diagnostic value of anti-mutated citrullinated vimentin in comparison to anti-cyclic citrullinated peptide and anti-viral citrullinated peptide 2 antibodies in rheumatoid arthritis: An Italian multicentric study and review of the literature. **Autoimmunity Reviews.**, v. 11, p. 815-820, 2012.

BARTON, A. *et al.* Investigation of polymorphism in the PADI4 gene in determining severity of inflammatory polyarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 64, p. 1311-1315, 2005.

BAS, S. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 42, p. 677-80, 2003.

BEGOVICH, A. B. *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet.**, v. 75, p. 330-337, 2004.

BERGLOVÁ, I. *et al.* B cell toll-like receptors with respect to the pathogenesis of Sjögren's Syndrome. **Acta Medica**, v. 54, n. 2, p. 51-57, 2011.

BERTOLO, M. B. *et al.* Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da artrite Reumatóide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 47, n. 3, p. 151-159, 2007.

BERTRAMS, J.; GROSSE-WILDE, H.; KUWERT, E. K. Normal distribution of factor B (Bf) allotypes in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.**, v. 1, n. 1, p. 137-140, 1981.

BESADA, E; NIKOLAISEN, C; NOSSENT, H. Diagnostic value of antibodies against mutated citrullinated vimentin for rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 29, p. 85-88, 2011.

BIZZARO, N. *et al.* Multicentric evaluation of a second assay to detect antiviral citrullinated peptide antibodies: a collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni. **Clin Pathol.**, v. 64, p. 1139-1141, 2011.

BOS, W. H. *et al.* Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anti-citrullinated protein antibody status: A prospective cohort study. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, p. 490-494, 2010.

BOTTO, M. *et al.* Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. **Molecular Immunology.**, v.46, p. 2774-2783, 2009.

BOUMANS, M. J. *et al.* Response to rituxmab in patients with rheumatoid arthritis in different compartments of the immune system. **Arthritis Rheum.**, v. 63, p. 3187-3194, 2011.

BRAHEE, D. D.; PIERRE-JEROME, C.; KETTNER, N. W. Clinical and radiological manifestations of rheumatoid wrist. A comprehensive review. **J Manipulative Physiol Ther.**, v. 26, n. 5, p. 323-329, 2003.

BRAI, M.; ACCARDO, P.; BELLAVIA, D. Polymorphism of the complement components in human pathology. **Annali Italiani di Medicina Interna**, Roma, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1994.

BRAUTBAR, C. *et al.* Immunogenetics of juvenile chronic arthritis in Israel. **J Rheumatol.**, v. 13, n. 6, p. 1072-1075, 1986.

BRENOL, C. V. *et al.* Rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 53, n. 5, p. 465-470, 2007.

BRODEUR J. P. *et al.* Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** V. 34, p. 1531-1537, 1991.

BROWN, K. K. Rheumatoid lung disease. **Proc Am Thorac Soc.** V. 4, n. 5, p. 443-448, 2007.

BRUNNER, J. *et al.* Analysis of the classical, alternative, and mannose binding lectin pathway of the complement system in the pathogenesis of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatol Int.**, v. 32, p. 1815-1818, 2012.

BURMAN, A. *et al.* A chemokine-dependent stromal induction mechanism for aberrant lymphocyte accumulation and compromised lymphatic return in rheumatoid arthritis. **J Immunol.**, v. 174, n. 3, p. 1693-1700, 2005.

CARROLL, M. V., SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v.63, p. 965-975, 2011.

CARSON, D. A. *et al.* Radioimmunoassay of IgG and IgM rheumatoid factors reacting with human IgG. **J Immunol.**, v. 119, n. 1, p. 295-300, 1977.

CHEN, M.; DAHA, M. R; KALLENBERG, C. G. The complement system in systemic autoimmune disease. **J Autoimmun.**, v. 34, n. 3, p. J276-286, 2010.

CIMMINO, M. A. *et al.* Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int.**, v. 16, p. 213-217, 2000.

CLAVEL, C. *et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  through Fc $\gamma$  receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 3, p. 678 – 688, 2008.

CONRAD, K. *et al.* Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. **Autoimmun Rev.**, v. 9, p. 431-435, 2010.

COOKE, T. D.; JASIN, H. E. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen induced arthritis I. The role of antigen on the local immune response. **Arthritis Rheum.**, v. 15, n. 4, p. 327-337, 1972.

Da SILVA, J. A., HALL, G. M. The effects of gender and sex hormones on outcome in rheumatoid arthritis. Baillieres. **Clin Rheumatol.**, v. 6, p. 196-219, 1992.

DAHLQVIST, S. R.; BECKMAN, G.; BECKMAN, L. Bf and C3 complement types in rheumatoid arthritis. **Hum Hered.**, v. 35, p. 240-245, 1985.

DAVRINCHE, C.; ABBAL, M.; CLERC, A. Molecular characterization of human complement factor B subtypes. **Immunogenetics.**, v. 32, p. 309-312, 1990.

DE MOUZON, A. *et al.* BF and C4 markers for insulin-dependent diabetes in basques. **The Lancet**, v. 2, n. 8156-8157, p. 1364, 1979.

DE RYCKE, L. *et al.* Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate and extra-articular manifestations. **Ann Rheum Dis.**, v. 63, p. 1587-1593, 2004.

DEJACO, C. *et al.* Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 8, R119, 2006.

DUNNE, J. V. *et al.* IgA rheumatoid factor in the sera and saliva of patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis.**, v. 38, p. 161-165, 1979.

DYER, P. A. *et al.* Properdin factor B alleles in patients with idiopathic membranous nephropathy. **Tissue Antigens**, v. 15, n. 5, p. 505-507, 1980.

DYER, P. A. *et al.* HLA and properdin factor B (Bf) in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 43, p. 118, 1984.

DYER, P. *et al.* Genetic variants of properdin factor B (Bf) in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.**, v. 12, n. 3, p. 456-457, 1985.

EDWARDS, J. C.; CAMBRIDGE, G.; LEANDRO, M. J. B cell depletion therapy in rheumatic disease. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v. 20, n. 5, p. 915-928, 2006.



EL-GHOBAREY, A.; WHALEY, K. Alternative pathway complement activation in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.**, v. 7, n. 4, p. 453-460, 1980.

EMERY, P. *et al.* Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis:evidence based development of a clinical guide. **Ann Rheum Dis.**, v. 61, p. 290-297, 2002.

ENGELMANN, R. *et al.* The anti-mutated citrullinated vimentin response classifies patients with rheumatoid arthritis into broad and narrow responders. **J Rheumatol.**, v. 36, p. 2670-2674, 2009.

FANANAS, L. *et al.* Complement genetic markers in schizophrenia: C3, BF and C6 polymorphisms. **Human Heredity**, v. 42, n. 3, p. 162-167, 1992.

FATHI, N. A. *et al.* Diagnostic performance and predictive value of rheumatoid factor, anti-cyclic-citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB I locus genes in rheumatoid arthritis. **Inter Arch Med.**, v. 1, n. 20 p. 1-7, 2008.

FARHAT, S. C. L. *et al.* Air pollution in autoimmune rheumatic disease. A review. **Autoimmun Rev.**,v. 11, n. 1, p. 14-21, 2011.

FARHUD, D. D.; ANANTHAKRISHNAN, R.; WALTER, H. Association between C'3 phenotypes and various diseases. **Humangenetik.**, v. 17, n. 1, p. 57-60, 1972.

FARRIES, T. C., LACHMANN, R. A., HARRISON, R. A. Analysis of the interaction between porperdin and factor B, components of the alternative-pathway C3 convertase of complement. **Biochem J.** v. 253, p. 667-675, 1988.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FIELDER, A. H. L. *et al.* HLA class III haplotypes in multicase theumatoid arthritis families. **Human Immunol.**, v. 25, p. 75-85, 1989.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 5, n. 423, p. 356-61, 2003.

FRIESE, M. A. *et al.* Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol.**, v. 121, n. 2, p. 406-415, 2000.

GÁL, P. *et al.* Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. **Mol Immunol.**, v. 46, n. 14, p. 2745-2752.

GARRED, P. *et al.* Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J Rheumatol.**, v. 27, p. 26-34, 2000.

GESERICK, G. *et al.* Factor B (BF) nomenclature statment. **Complement and Inflammation.**, v. 7, n. 4-6, p. 255-260, 1990.

GIBOFSKY, A. A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am J Manag Care.**, v. 18, p.S295-302, 2012.

GOELDNER, I. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients and relatives from Brazil. **Rheumatology**, v. 49, n. 8, p. 1590-1593, 2010a.

GOELDNER, I. *et al.* Autoantibodies for gastrointestinal organ specific autoimmune diseases in rheumatoid arthritis patients and their relatives. **Clin Rheumatol.**, 2010b.

GOELDNER, I. *et al.* Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid patients from southern Brazil. **Clin Rheumatol.**, v. 30, p. 975-980, 2011.

GOELDNER, I. *et al.* Mannose binding lectin and susceptibility to rheumatoid arthritis in brazilians patients and their relatives. **Plos One**, v. 9, n. 4, p.e 95519, 2014a.

GOELDNER, I. *et al.* Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives. **Plos One**, v. 9, n. 3, p.e 90979, 2014b.

GOLDBACH-MANSKY, R. *et al.* Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. **Arthritis Res**, v. 2, p.236-243, 2000.

GORMAN, J. D. *et al.* Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis. **Arthritis Rheum.**, v. 50, p. 3476-3484, 2004.

GRAUDAL, N. A. *et al.* The association of variant MBL genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 515-21, 2000.

GREGERSEN, P. K., SILVER, J., WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 30, p. 1205-1213, 1987.

HAMES, B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B. D. & Rickwood, D. (eds). Gel electrophoresis of proteins. Oxford. IRL Press Limited, 1981, p. 1-91.

HAPPONEN, K. E. *et al.* Serum COMP-C3b complexes in rheumatic diseases and relation to anti-TNF- $\alpha$  treatment. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, p:1-9, 2012.

HARNEY, S.; WORDSWORTH, B. P. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 6, p. 465-73, 2002.

HAPPONEN, K. E. *et al.* Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnosis principle in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatism**, v. 62, p. 3574-3583, 2010.

HARRISON, T.R.; FAUCI, A. S. Harrison Medicina Interna. 17 ed. V2v. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2008.

HIETALA, M. A. *et al.* Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. **J Immunol.**, v. 169, n. 1, p. 454-459, 2002.

HUGHES, A. E.; MULLAN, G. M.; BRADLEY, D. T. Complement factor B polymorphism 32W protects against age-related macular degeneration. **Molecular Vision**, v. 17, p. 983-988, 2011.

HUIZINGA, T. *et al.* Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of HLA-DTB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. **Arthritis Rheum.**, v. 52, p. 3433-3438, 2005.

IMBODEM, J. B. The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Annu Rev Pathol Mech Dis.**, v. 4, p. 417 – 434, 2009.

INNALA, L. *et al.* Antibodies against mutated citrullinated vimentin are a better predictor of disease activity at 24 months in early rheumatoid arthritis than antibodies against cyclic-citrullinated peptides. **J Rheumatol.**, v. 35, p. 1002-1008, 2008.

IOAN-FACSINAY, A. *et al.* Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. **Arthritis Rheum.**, v.58, p. 3000-3008, 2008.

IWAMOTO, T. *et al.* Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. **The FBS Journal.**, v. 275, p. 4448-4455, 2008.

JACOBSEN, S. *et al.* The influence of the mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. **J Rheumatol.**, v. 28, n. 5, p. 935-24, 2001.

JAWAHEER, D. *Et al.* Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 54, p. 3087-3094, 2006.

Jl, H. *et al.* Arthritis Critically Dependent on Innate Immune System Players. **Immunity.**, v. 16, p. 157-168, 2002.

JÓNSSON, T. *et al.* Population study of the importance of rheumatoid factor isotypes on adults. **Ann Rheum Dis.**, v. 51, n. 7, p. 863-868, 1992.

JÓNSSON, T. *et al.* Raised IgA rheumatoid factor (RF) but not IgM RF or IgG RF is associated with extra-articular manifestation in rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol.**, v. 24, n. 6, p. 372-375, 1995.

JOSE, P. J. *et al.* Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. **Ann Rheum Dis.**, v. 49, p. 747-752, 1990.

KANG, Y. H. *et al.* Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathway. **Adv Exp Med Biol**, v. 653, p. 117-128, 2009.

KANG, Y. M. *et al.* CD8T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. **J Exp Med.**, v. 195, p. 1325-1336, 2002.

KASTBOM, A. *et al.* Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). **Ann Rheum Dis.**, v. 63, n. 9, p. 1085-1089, 2004.

KATSCHKE *et al.* A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. **J Exp Med.** V. 204, p. 1319-1325, 2007.

KEMPER, C. *et al.* The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 105, p. 9023-9028, 2008.

KESKIN, G. *et al.* Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis. **Protein Pept Lett.**, v. 15, n. 3, p. 314-317, 2008.

KIM, S. K. *et al.* Greater prevalence of seropositivity for anti-cyclic citrullinated peptide antibody in unaffected first-degree relatives in multicase rheumatoid arthritis-affected families. **Korean J Intern Med.**, v. 28, p. 45-53, 2013.

KIRKHAM, B. W. *et al.* Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study. **Arthritis Rheum.**, v. 54, n. 4, p. 1122-1131, 2006.

KLARESKOG, L. *et al.* Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Immunology.**, v. 18, p. 650-655, 2006.

KLARESKOG, L. *et al.* Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. **Ann Rev Immunol.**, v. 26, p. 651-675, 2008.

KOBAYASHI, S. *et al.* Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. **FEBS Journal.** v. 275, p. 4456 – 4462, 2008.

KOKKONEN, H *et al.* Antibodies of IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 13, R13, 2011.

KOLFENBACH, J. R. *et al.* A prospective approach to investigating the natural history of preclinical rheumatoid arthritis (RA) using first-degree relatives of probands with RA. **Arthritis Rheum.**, v. 61, n. 12, p. 1735-1742, 2009.

KOUSKOFF, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoreactivity. **Cell.**, v. 87, p. 811-822, 1996.

KWOH, C. K. *et al.* Age, sex, and the familial risk of rheumatoid arthritis. **Am J Epidemiol.** v. 144, p. 15-24, 1996.

LACHMANN, P. J. Complement alternative pathway. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. *Encyclopedia of Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1992. p. 371-372.

LAMBRIS, J. D.; SAHU, A.; WETSEL, R. A. The chemistry and biology of C3, C4 and C5. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. **The Human complement system in health and disease**. 1. ed. New York : Marcel Dekker, 1998. p. 83-118.

LANCHBURY, J. S.; PAL, B.; PAPIHA, S. S. Bf and C3 polymorphism in rheumatoid arthritis. **Hum Hered.**, v. 37, p. 144-149, 1987.

LANDEWE, R. B. The benefits of early treatment in rheumatoid arthritis: confounding by indication, and the issue of timing. **Arthritis Rheum.**, v. 48, p. 1-5, 2003.

LAUFER, T. M. Inflammatory arthritis-an exciting confluence of human and animal research. **Immunol Rev.**, v. 233, n. 1, p. 5-8, 2010.

LI, G. *et al.* Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway. **Mol Immunol.**, v. 53, n. 3, p. 227-236, 2013.

LIAO, K. P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 21, n. 3, p. 279- 83, 2009.

LINDQVIST, E. *et al.* Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 64, p. 196-201, 2005.

LISZEWSKI, B. A.; ATKINSON, J. P. Complement pathway. UpToDate, 2007.

LOSSIUS, A. *et al.* Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis – association and causation. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3701-3730, 2012.

LOW, J. M.; MOORE, T. L. A role for the complement system in rheumatoid arthritis. **Curr Pharm Des.**, v. 11, n. 5, p. 655-670, 2005.

LUIME, J. J. *et al.* Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review : **Ann Rheum Dis.**, v. 69, p. 337-344, 2010.

LUNDBERG, K. *et al.* Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. **Arthritis Res Ther.**, v. 7, p. R458-R467, 2005.

LUNDSTRÖM, E. *et al.* Gene environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 6, p. 1597-1603, 2009.

LÚOVÍKSSON, B. R. *et al.* Disease manifestations in patients with isolated elevation of IgA rheumatoid factor. **Scand J Rheumatol.**, v. 21, p. 1-4, 1992.

LUTTERI, L.; MALAISE, M.; CHAPELLE, J. P. Comparison of second and third generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies assays for detecting rheumatoid arthritis. **Clin Chim Acta.**, v. 386, p. 76-81, 2007.

MacGREGOR, A. *et al.* HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis : increased association in men, young age at onset, and disease severity. **J Rheumatol.**, v. 22, p. 1032-1036, 1995.

MacGREGOR, A. J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 30–37, 2000.

MACHOLD, K. P. *et al.* Very recent onset arthritis-clinical, laboratory and radiological findings during the first year of disease. **J Rheumatol**, v. 29, p. 2278-2287, 2002.

MAKRYGIANNAKIS, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. **Ann Rheum Dis.**, v. 67, n. 10, p. 1488-92, 2008.

MANFREDSDOTTIR, V. F. *et al.* The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activity and joint damage in early rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 45, n. 6, p. 734-740, 2006.

MARAINA, CHC, NURDAYANA, AK, RUSNI D, AZWANY Y. Diagnostic value of anti-modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic**. v. 13, n. 4, p. 335-339, 2010.

MARTÍNEZ CASTRO, E. *et al.* Rheumatoid arthritis and Sjögren syndrome: special reference to the course time of rheumatoid arthritis. **Med Clin Barc.**, v. 94, p. 655-659, 1990.

MASSON-BESSIÈRE, C. *et al.* The major synovial targets of the rheumatoid specific antilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha and beta chains of fibrin. **J Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 4177-4184, 2001.

MATTESON, E. L. Extra-articular features of Rheumatoid Arthritis and systemic involvement. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. **Rheumatology** 3 ed. Mosby-Elsevier, 2003; p.781-792.

MATTEY, D. L. *et al.* Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p. 640-646, 2002.

MAUFF, G.; GAUCHEL, F. D.; HITZEROTH, H. W. Polymorphism of properdin factor B in south african, negroid, indian and colored populations. **Human Genetics**, v. 33, n. 3, p. 319-322, 1976.

McLEAN, R. H.; WINKELSTEIN, J. A. Genetically determined variation in the complement system: relationship to disease. **Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 105, n. 2, p. 179-188, 1984.



MESSIAS-REASON, I. T. *et al.* Genetic variability of the MHC class III complement proteins C2, BF, C4A and C4B in southern Brazil. **Exp Clin Immunogenet.**, v. 11, n. 4, p. 192-196, 1994.

MESSIAS-REASON, I. J.; URBANETZ, L.; PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 4, p. 308-312, 2003.

MEWAR, D.; WILSON, A. G. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. **Biomed Pharmacother.**, v. 60, n. 10, p. 648-655, 2006.

MEYER, J. M. *et al.* Sex influences on the penetrance of HLA shared epitope genotypes for rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet.**, v. 58, n. 2, p. 371-383, 1996.

MIGONE, N. *et al.* Bf polymorphism and ankylosing spondylitis. **The Lancet**, London, v. 2, n. 15, p. 163, 1978.

MILDER, F. J. *et al.* Factor B structure provides insights into the activation of the central protease of the complement system. **Nature**, v. 14, p. 224-228, 2007.

MISIANO, G. *et al.* Allotipi di C4 e Bf nel diabete insulino-dipendente in pazienti di età pediatrica. **Rivista Italiana di Pediatria**, Ospedalleto, v. 15, p. 131-136, 1989.

MOELANTS, E. A. *et al.* Regulation of TNF- $\alpha$  with a focus on rheumatoid arthritis. **Immunol Cel Biol.**, v. 91, p. 393-401, 2013.

MONACH, P. A. *et al.* Circulating C3 is necessary and sufficient for induction of autoantibody-mediated arthritis in a mouse model. **Arthritis & Rheumatism.**, v. 56, n. 9, p. 2968-2974, 2007.

MONTES, T. *et al.* Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 11, p. 4366-4371, 2009.

MORGAN, B. P. The complement system: an overview. **Methods Mol Biol.**, v. 150, p. 1-13, 2000.

MOURA, M. C. *et al.* Perfil dos pacientes com manifestações extra-articulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. **Ver Bras Reumatol.**, v. 52, n. 5, p. 679-694, 2012.

NELL-DUXNEUNER, V. *et al.* Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, n. 1, p. 169-174, 2010.

NEUMANN, E. *et al.* Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 4, p. 934-945, 2002.

NICAISE ROLAND, P. *et al.* Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. **Arthritis Res Ther.**, v. 10, p.R142, 2008.

NIELEN, M. M. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 2, p. 380-6, 2004.

NISHIMURA, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med.**, v. 146, n. 11, p. 797 – 808, 2007.

OKEMEFUNA, A. I. *et al.* Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 2, p. 1053-1065, 2010.

OKROJ, M. *et al.* Rheumatoid arthritis and the complement system. **Ann Med.**, v. 39, n. 7, p. 517-530, 2007.

ORREN, A.; PRESCOTT, R. A. Bf FI and C22 gene frequencies in patients with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) from three South African populations. **Tissue Antigens.** v. 22, n. 5, p. 385-388, 1983.

PABLOS, J. L.; CAÑETE, J. D. Immunopathology of rheumatoid arthritis. **Curr Top Med Chem.**, v. 13, n. 6, p. 705-711, 2013.

PADYUKOV, L. *et al.* A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 10, p. 3085-3092, 2004.

PAIMELA, L. *et al.* Prognostic significance of complement alleles Bf and C4 in early rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol.**, v. 15, n. 6, p. 594-598, 1996.

PAPADOPOULOS, N. G. *et al.* Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients? **Clin Exp Rheumatol.**, v. 23, p. 861-866, 2005.

PICCELLI, V. F. **Estudo da via alternativa do sistema complemento e de doenças autoimunes associadas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PIKE, R. M.; SULKIN, S. E.; COGGESHALL, H. C. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes. **J Immunol.**, v. 63, n. 4, p. 447-463, 1949.

PILLEMER, L. *et al.* The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**, v. 120, p. 279-285, 1954.

PLENGE, R. M. *et al.* Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. **Am J Hum Genet.**, v. 77, p. 1044-1060, 2005.

POULSOM, H; CHARLES, P. J. Antibodies to citrullinated vimentin are a specific and sensitive marker for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Clin Rev Allergy Immunol.**, v. 34, p. 4-10, 2008.

PRATESI, F. *et al.* Antibodies to a new viral citrullinated peptide, VCP2: fine specificity and correlation with anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) and anti-VCP1 antibodies. **Clin Exp Immunol.**, v. 164, p. 337-345, 2011.

PRATT, A. G.; ISAACS, J. D.; MATTEY, D. L. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v. 23, n. 1, p. 37-48, 2009.

PRODINGER, W. H. *et al.* Complement. In: PAUL, W. **Fundamental Immunology.** 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. P. 967-995.

QUIRKE, A. M. *et al.* Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for

breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, 2013 Mar 28 [Epub ahead of print].

RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 10, p. 2741-2749, 2003.

RASHID, T.; EBRINGER, A. Autoimmunity in rheumatic disease induced by microbial infection via crossreactivity or molecular mimicry. **Autoimmune Dis.**, doi:10.1155/2012/539282, 2012.

RAZA, K. *et al.* Anti-modified citrullinated vimentin (MCV) antibodies in patients with very early synovitis. **Ann Rheum Dis.** v. 69, p. 627-628, 2010.

REPARON-SCHUIJT, C. C. *et al.* Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 1, p. 41, 2001.

RICHMAN, N. C. *et al.* Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis in a multiethnic cohort of predominantly Hispanic and Asian patients. **Medicine**, v. 92, p. 92-97, 2013.

RICKLIN, D. *et al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol.**, v. 11, n. 9, 2010.

RITTNER, C. Complement, genetics. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2 ed. London: Academic Press, 1992. P. 382-385.

RITTNER, C.; BERTRAMS, J. On the significance of C2, C4 and factor B polymorphisms in disease. **Hum Genet.**, v. 56, n. 3, p. 235-247, 1981.

RITTNER, C. Complement, genetics. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Encyclopedia of Immunology**. 2 ed. London. Academic Press, 1992, p.382-385.

RITTNER, C.; SCHNEIDER, P. M. Complexity of MHC class III genes and complement polymorphism. **Immunology Today**, Cambridge, v. 10, n. 12, p. 401-403, 1989.

RITTNER, C.; SCHNEIDER, P. M. Genetics and polymorphism of the complement components. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. **The complement system**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p. 80-135.

ROJAS-VILLARRAGA, A. *et al.* Familial disease, the HLA-DRB1 shared epitope and anti-CCP antibodies influence time at appearance of substantial joint damage in rheumatoid arthritis. **J Autoimmun.**, v. 32, n. 1, p. 64-9, 2009.

ROLAND, P. *et al.* Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP negative patients and for monitoring infliximab therapy. **Arthritis Res Ther.**, v. 10, p. R142, 2008.

SACRE, S. M. *et al.* The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive process in a human model of rheumatoid arthritis. **Am J Pathol.**, v. 170, n. 2, p. 518-525, 2007.

SAEVARSDOTTIR, S. *et al.* Low MBL predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. **J Rheum.**, v. 28, p. 728-734, 2001.

SAXNE, T; MÂNSSON, B.; HEINEGARD, D. Biomarkers for cartilage and bone in rheumatoid arthritis. **Oxford University Press.**, 2; 2006.

SCHGELLEKENS, G. A. *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43:155-63.

SCHOLL, H. P. *et al.* Systemic complement activation in age-related macular degeneration. **Plos One**, v. 3, n. 7, p. e2593, 2008.

SCHWAEBLE, W. J.; REID K. B. M. Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? **Immunol Today.**, v. 20, p. 17-21, 1999.

SEITSONEN, S. *et al.* Screening of DNA-variants in the properdin gene (CPF) in age-related macular degeneration (AMD). **Mol Immunol.**, v. 47, n. 6, p. 1334-1336, 2010.

SELDIN, M. *et al.* The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 1071-1079, 1999.

SEONG-KYU, K. *et al.* Greater prevalence of seropositivity for anti-cyclic citrullinated peptide antibody in unaffected first-degree relatives in multicase rheumatoid arthritis-affected families. **Korean J Intern Med.**, v. 28, p. 45-53, 2013.

SILMAN, A. J. *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. **Br J Rheumatol.**, v. 32, p. 903-907, 1993.

SILVA, I. G. **Investigação de autoimunidade em pacientes com artrite reumatoide e familiares: uma análise clínico-laboratorial.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SINGH, U. *Et al.* Is rheumatoid factor still a superior test for the diagnosis of rheumatoid arthritis? **Rheumatol Int.**, v. 30, n.8, p.1115-1119, 2010.

SIZOVA, L. Diagnostic value of antibodies to modified citrullinated vimentin in early rheumatoid arthritis. **Hum Immunol.**, v. 73, n. 4, p. 389-392, 2012.

SJÖBERG, A. P. *et al.* The extracellular matrix and inflammation fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. **J Biol Chem.**, v. 280, p. 32301-32308, 2005.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, BLOM. Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. **Mol Immunol.**, v. 46, p. 830-839, 2009.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, L. A.; BLOM, A. M. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Cell Press.**, v. 30, n. 2, p. 83-90, 2009.

SKARE, T. L. Reumatologia: princípios e prática. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007; p.335.

SPITZER, D. *et al.* Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. **J Immunol.**, v. 179, p. 2600-2608, 2007.

STASTNY, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med.**, v. 298, p. 869-871, 1978.

STEINBROCKER, O.; TRAEGER, C. H.; BATTERMAN, R. C. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. **JAMA**, v. 140, p. 14-21, 1949.

STOLT, P. *et al.* Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control, using incident cases. **Ann Rheum Dis.**, v. 62, p. 835-841, 2003.

STOLT, P. *et al.* Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. **Ann Rheum Dis.**, v. 64, p. 582-586, 2005.

SUZUKI, A. *et al.* Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. **Nat Genet.**, v. 35, p. 341-348, 2003.

SUZUKI, A.; YAMADA, R.; YAMAMOTO, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1108, p. 323-339, 2007.

SVARD, A. *et al.* A comparison between IgG and IgA class antibodies to cyclic citrullinated peptides and to modified citrullinated vimentin in early rheumatoid arthritis and very early arthritis. **J Rheumatol.**, v. 38, p. 1265-1272, 2011.

SVENDSEN, A. J. *et al.* Relative importance of genetic effects in rheumatoid arthritis: historical cohort study of Danish nationwide twin population. **BMJ**, v. 324, n. 7332, p. 264-266, 2002.

SVERDRUP, B. *et al.* Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. **Arthritis Res Ther.**, v. 7, p. R1296-R1303, 2005.

SWANBERG, M. *et al.* MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. **Nat Genet.**, v. 37, p. 486-494, 2005.

SYMMONS, D. P. Epidemiology of rheumatoid arthritis : determinants of onset, persistence and outcome. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v. 16, p. 707-722, 2002.

SYVERSEN, S. W. *et al.* Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, p. 345-351, 2010.

SZEKANECZ, Z. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol.*, v. 34, n. 1, p. 26-31, 2008.

SZODORAY, P. *et al.* Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.**, v. 9, n. 3, p. 140-143, 2010.

TAKAHARA, H. *et al.* Peptidylarginine deiminase of the mouse. Distribution, properties, and immunocytochemical localization. **J Biol Chem.**, v. 264, p. 13361-13368, 1989.

TAKEUCHI, F. *et al.* Susceptibility epitope on HLA-DR beta chain for rheumatoid arthritis and the effect of the positivity on the clinical features. **J Immunogenet.**, v. 16, n. 6, p. 475-483, 1989.

TAYLOR, P. *et al.* A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. **Autoimmun Dis.**, 815038, 2011.

TAYLOR, P. *et al.* A systematic review of serum biomarkers anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis. **Autoimmun Dis.**, 815038, 2011.

TEDESCHI, S. K.; BERMAS, B.; COSTENBADER, K. H. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. **Clin Immunol.**, v. 6616, n. 13, 2013.

TEHLIRIAN, C.V.; BATHON, J.M. Rheumatoid arthritis: clinical and laboratory manifestations. In: STONE, J.H., CROFFORD, L.J. WHITE, P.H. **Primer on the rheumatic diseases**. 30 ed. New York: Springer, 2008. p. 114-121.

TEITSSON, I. *et al.* Prospective study of early rheumatoid arthritis. I Prognostic value of IgA rheumatoid factor. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 43, p. 673-678, 1984.



TEITSSON, I. IgA rheumatoid factor as predictor of disease activity. **Scand J Rheumatol Suppl.**, v. 75, p. 233-237, 1988.

TEZENAS, M. *et al.* New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. **Arthritis Rheum.**, v. 52, p. 1063-1068, 2005.

THIEL, S. *et al.* Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. **J Immunol.**, v. 182, n. 5, p. 2939-2947, 2009.

TOKUNAGA, K. *Et al.* Polymorphism of properdin factor B in japanese. Description of a rare variant and data of association with HLA and C2. **Human Genetics.**, v. 60, n. 1, p. 42-45, 1982.

TRINDADE, J. M. F. *et al.* O sistema complemento. **Temas de Reumatologia Clínica.**, v.9, n.1, p. 17-23, 2008.

TROELSEN, A. *et al.* K. Ultrasound versus magnetic resonance arthrography in acetabular labral tear diagnostics: a prospective comparison in 20 dysplastic hips. **Acta Radiol.**, v. 48, n. 9, p. 1004-10, 2007.

TROUW, L. A. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. **Arthritis Rheum.**, v. 60, n. 7, p. 1923-1931, 2009.

TURRESON, C.; JACOBSON, L.; BERGSTRÖM, U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. **Rheumatology**, v. 38, n. 7, p. 668-674, 1999.

TURESSON, C. *et al.* Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Ann Rheum Dis.**, v. 62, n. 8, p. 722-727, 2003.

TURESSON, C. *et al.* The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 7, n. 6, p. R1386-1393, 2005.

TURESSON, C. *et al.* Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 66, n. 1, p. 59-64, 2007.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Vasculitis in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 21, n. 1, p. 35-40, 2009.

TURIEL, M. *et al.* Il coinvolgimento cardiac nell' artrite reumatoide. **Rheumatismo**, v. 61, n. 4, p. 244-253, 2009.

URSUM, J. *et al.* Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. **Arthritis Research and Therapy.**, v. 10, R12, 2008.

UTIYAMA, S. R. R.; MESSIAS-REASON, I. T.; KOTZE, L. M. Conceitos atuais na ativação do sistema complemento e suas propriedades biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.**, v. 36, n. 3, p. 183-188, 2004.

UTIYAMA, S. R.; SILVA KOTZE, L. M.; MESSIAS\_REASON, I. T. Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity of coeliac disease in patients and relatives. **Int J Immunogenet.**, v. 32, n. 5, p. 307-314, 2005.

VALLBRACHT, I. *et al.* Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v 63, p. 1079-1084, 2004.

VALLBRACHT, I.; HELMKE, K. Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.**, v. 4, n. 6, p. 389-394, 2005.

VAN BOEKEL, M. A, *et al.* Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. **Arthritis Res.**, v. 4, p. 87-93, 2002.

VAN DER HELM VAN MIL, A. H. *et al.* Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progresión of theumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 7, p. R949-R958, 2005.

VAN DER HELM VAN MIL, A. H. M. *et al.* The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. **Arthritis Rheum.**, v. 56, p. 425-432, 2007.

VAN DER LIDEN, M. P. *et al.* Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 60, p. 2232-2241, 2009.

VAN DER LIDEN, M. P. *et al.* Comparison of the 1987 American College of Rheumatology Criteria and the 2010 American College of Rheumatology / European League against Rheumatism criteria. **Arthritis Rheum.**, v. 63, p. 37-42, 2011.

VAN DER WOUDE, D. *et al.* Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 69, p. 1554-1561, 2010.

VAN VENROOIJ, W. J.; ZENDMAN, A. J.; PRUIJN, G. J. Autoantibodies to citrullinated antigen in (early) rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev.**, v. 6, p. 37-41, 2006.

Van ZEBEN, D. *et al.* Properdin factor B and complement factor C4 allotypes in rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. **Hum Immunol.**, v. 33, n. 2, p. 148-151, 1992.

VENCOVSKY, J. *et al.* Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 62, n. 5, p. 427-430, 2003.

VISSER, H. *et al.* How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p. 357-365, 2002.

VIATLI, C. *et al.* Classification criteria for Sjögren syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. **Ann Rheum Dis.**, v. 61, n. 6, p. 554-558, 2002.

VIVANCO, F. *et al.* The covalent interaction of C3 with IgG immune complexes. **Mol Immunol.**, v. 36, p. 843-852, 1999.

VOLANAKIS, J. E. Overview of the complement system. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M. M. The human complement system in health and disease. 1<sup>st</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 9-32.

VOSSENAAR, E. R. *et al.* Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 9, p. 2489-2500, 2003.

VOSSENAAR, E. R. *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. **Arthritis Res Ther.**, v. 6, p. R142-150, 2004.

VOSSENAAR, E. R.; ZENDMAN, A. J.; VAN VENROOIJ, W. J. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2004.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, v.344, n.14, p.1058-66, 2001.

WARLOW, R. S. *et al.* Extractable nuclear antigens (ENA) auto-antibodies in SLE: an immunogenetic relationship with HLA, C4 and BF alleles. **Clin Exp Immunol.**, v. 63, p. 419-427, 1985.

WARLOW, R. S. *et al.* HLA, C4, Bf, Gm and auto-antibodies in rheumatoid arthritis. **Exp Clin Immunogenet.**, v. 5, p. 133-142, 1988.

WATZKO, W. L.; MESSIAS, I. J. T. Associação entre as variantes genéticas de C3, BF, C4A, C4B do sistema complemento e artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 34, n. 5, p. 243-252, 1994.

WEAVER, C. T. *et al.* Th17: an effector CD4T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**. V. 24, p. 677-688, 2006.

WEYAND, C. M. *et al.* The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 5, p. 817-822, 1998.

WILK, A. S. *et al.* All you wanted to know about anti-CCP but were afraid to ask. **Autoimmun Rev.**, v. 10, p. 90-93, 2010.

WILDER, R. L. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol Suppl**, v. 44, p. 10-12, 1996.

WILLEMZE, A. *et al.* The influence of anti-CCP status and characteristics on the course of RA. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 8, p. 144-152, 2012.

WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **J Immunol.**, v. 167, p. 1601-1608, 2001.

WITHRINGTON, R. H. *et al.* Prospective study of early rheumatoid arthritis. II Association of rheumatoid factor isotypes with fluctuation in disease activity. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 43, p. 679-685, 1984.

WU, Y. L. *et al.* Clinical presentations and molecular basis of complement C1r deficiency in a male African-American patient with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 20, n. 11, p. 1126-1134, 2011.

YAMAMOTO, I.; PORTINHO, C. P. Sistema Complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev Ass Med Brasil.**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

YOUNG, K. A. *et al.* Relatives without rheumatoid arthritis show reactivity to anti-citrullinated protein/peptide antibodies which are associated with arthritis-related traits: studies of the etiology of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 65, p. 1995-2004, 2013.

ZANELLI, E.; BREEDVELD, F. C.; de VRIES, R. R. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect. **Rheumatology**, v. 39, p. 1060-1066, 2000.

ZIOLKOWSKA, M. *et al.* High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporine A-sensitive mechanism. **J Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2832-2838, 2000.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: INICIAIS, GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL .....	153
APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, INICIAIS, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO .....	162
APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: Nº, INICIAIS, GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO .....	168
APÊNDICE 4 – DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NÚMERO, INICIAIS, GÊNERO, IDADE, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA E FENÓTIPO DE BF .....	176
APÊNDICE 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES .....	179

## CODIFICAÇÕES

Para “GÊNERO”: 1 = masculino; 2 = feminino

Para “ETNIA”: 1 = euro-brasileiro; 2 = afrodescendente; 3 = ameríndio

ND = não determinado; SI = sem informação; S = sim; N = não

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
1	1	2	48	45	3	155	121	0	5	SF	2
2	2	1	52	25	27	19	42	0	7	SF	1
3	2	1	39	39	0	7	10	1920	32	S	3
4	2	1	80	69	11	168	1488	0	6	SF	4
5	1	2	67	62	5	216	2208	240	67	S	1
6	2	SI	60	49	11	9	50	0	4	S	3
7	1	1	56	52	4	253	2208	3840	198	ND	1
8	2	2	41	23	18	13	57	0	2	SF	1
9	2	1	52	47	5	19	105	60	65	S	2
10	2	1	42	33	9	171	2208	0	15	S	1
11	2	SI	31	29	2	245	2208	60	15	S	1
12	2	1	30	23	7	11	152	120	7	S	1
13	2	2	37	25	12	82	12	30	5	F	2
14	2	1	34	28	6	178	2208	120	24	S	2
15	2	1	42	38	4	171	333	240	29	SS07	1
16	2	1	51	45	6	8	56	0	3	F	1
17	2	2	44	39	5	59	100	30	28	SF	1
18	2	1	68	33	35	189	1402	0	4	SS07	2
19	2	1	29	18	11	157	415	0	84	S	1
20	2	1	36	31	5	169	1933	0	3	SF	1
21	2	1	54	33	21	175	110	7680	125	S	1
22	2	1	65	62	3	111	1702	30	2	S	2
23	2	2	24	24	0	51	8	240	12	S	2
24	2	SI	26	26	0	223	89	480	131	S	2
25	2	SI	51	51	0	109	360	3840	60	ND	3

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
26	2	SI	40	31	9	163	76	240	137	S	2
27	2	1	59	43	16	173	2208	480	8	S	3
28	2	1	54	54	0	92	67	480	36	S	2
29	1	SI	55	28	27	77	1988	3840	198	ND	2
30	2	2	48	27	21	29	31	30	5	SF	1
31	2	SI	49	41	8	8	16	480	46	ND	2
32	2	1	71	71	0	209	1130	60	14	F	2
33	2	2	55	55	0	202	58	60	6	S	1
34	2	1	50	30	20	87	64	60	6	S	1
35	1	SI	60	48	12	188	1002	480	79	S	3
36	2	1	46	44	2	24	28	480	125	ND	2
37	1	1	24	21	3	13	63	0	67	S	1
38	2	SI	44	25	19	202	1947	0	8	S	2
39	2	SI	59	53	6	34	79	480	38	S	1
40	2	SI	37	36	1	7	13	60	5	S	2
41	2	1	36	25	11	16	16	0	1	SF	1
42	2	2	45	25	20	9	15	0	1	S	1
43	1	1	34	22	12	141	199	120	97	F	1
44	2	1	41	28	13	13	17	0	1	SF	1
45	2	SI	65	64	1	35	1141	480	153	ND	1
46	2	2	30	19	21	58	362	0	2	SF	2
47	1	SI	54	54	0	86	167	240	198	ND	1
48	2	1	42	35	7	8	27	0	3	ND	1
49	2	1	55	45	10	160	77	0	4	SF	2
50	2	SI	66	60	6	217	2208	0	11	ND	2



APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
51	2	SI	53	46	7	21	212	480	182	S	2
52	1	SI	26	24	2	144	2208	3840	198	ND	1
53	2	SI	58	53	5	184	2044	480	81	ND	1
54	2	SI	76	75	1	11	23	0	3	ND	1
55	2	SI	50	47	3	15	13	0	12	ND	1
56	1	1	55	53	2	8	83	0	1	S	1
57	2	SI	57	47	10	25	103	0	7	S	1
58	2	1	66	55	11	182	121	480	55	ND	2
59	2	1	51	46	5	115	55	240	50	S	1
60	2	SI	69	52	17	250	2208	480	198	ND	1
61	2	SI	65	29	36	245	2208	480	46	ND	2
62	2	2	80	65	15	36	993	120	30	S	3
63	2	1	61	53	8	124	418	0	66	SF	1
64	2	1	58	54	4	11	13	0	1	S	1
65	1	1	59	54	5	8	38	120	1	S	1
66	2	SI	30	23	7	8	17	0	2	ND	2
67	1	2	54	47	7	120	469	240	19	SF	2
68	2	1	48	48	0	248	153	480	72	S	1
69	2	1	61	50	11	213	2208	960	26	S	3
70	1	SI	55	45	10	224	2208	480	8	ND	3
71	2	1	27	27	0	190	1194	480	9	ND	1
72	2	1	63	60	3	125	395	120	23	ND	1
73	2	1	47	37	10	129	64	480	45	S	3
74	2	1	37	30	7	38	78	240	39	SF	1
75	2	2	55	50	5	192	1206	960	48	SF	2

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
76	2	2	44	43	1	7	12	0	0	S	2
77	2	2	53	40	13	8	13	0	2	F	2
78	2	2	54	40	14	186	1720	480	97	S	3
79	2	1	60	49	11	253	2208	480	59	FS07	2
80	2	1	54	50	4	8	28	30	4	ND	2
81	2	2	51	50	1	158	175	0	4	SF	2
82	2	1	62	55	7	242	2208	480	37	S	2
83	2	1	59	29	30	221	1838	480	101	ND	3
84	2	1	53	24	29	60	36	120	28	S	2
85	2	2	41	29	12	25	307	240	28	S	2
86	2	1	49	25	24	185	2208	0	5	S	3
87	2	2	59	49	10	50	169	960	97	S	2
88	2	1	44	42	2	186	107	960	77	ND	1
89	2	SI	48	32	16	254	2676	480	90	S	2
90	2	1	55	44	11	60	1779	120	24	S	1
91	2	1	84	83	1	129	104	0	83	S	2
92	2	2	53	50	3	10	26	0	1	S	1
93	2	3	44	44	0	221	923	120	12	S	1
94	2	1	51	47	4	99	356	480	97	SS07	3
95	2	2	53	53	0	211	80	480	32	S	1
96	1	1	50	28	22	10	15	0	2	S	3
97	2	1	59	49	10	208	242	480	6	S	4
98	2	1	44	43	1	50	864	480	6	S	1
99	2	1	40	30	10	191	458	1920	110	SF	1
100	2	1	47	38	9	193	295	160	77	S	3

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
101	1	1	57	53	4	120	2170	320	78	SF	2
102	2	1	80	20	60	67	45	120	46	SF	2
103	2	1	63	58	5	221	2676	3840	120	SF	2
104	2	1	51	47	4	54	2676	1920	38	S	1
105	2	1	75	36	39	41	217	60	3	SF	3
106	2	1	32	30	2	7	16	0	2	S	2
107	2	1	52	46	6	16	70	0	6	S	1
108	2	1	44	36	8	216	266	120	9	S	1
109	2	2	50	46	4	142	967	0	125	SF	1
110	2	2	57	54	3	227	1558	480	50	S	2
111	1	1	61	55	6	238	2676	480	17	SF	2
112	2	2	44	36	8	10	33	60	31	FF1	2
113	2	1	50	48	2	12	20	60	18	SF1	1
114	2	2	59	50	9	37	139	480	50	S	1
115	1	1	57	49	8	244	2676	60	125	FS07	2
116	2	1	37	27	10	19	24	0	5	S	1
117	2	2	74	66	8	70	74	0	56	S	1
118	2	1	46	43	3	8	16	0	1	S	2
119	2	1	57	56	1	246	2676	0	13	SF	1
120	2	1	58	53	5	69	46	480	4	S	3
121	2	1	47	46	1	31	28	240	74	FS07	1
122	1	1	32	25	7	122	914	480	12	S	3
123	2	1	55	54	1	14	11	0	1	S	2
124	2	2	51	43	8	10	27	0	4	SS07	2
125	2	1	55	50	5	19	25	60	18	S	1

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
126	2	1	46	20	26	93	74	480	25	S	2
127	2	1	54	43	11	22	27	3840	125	F	1
128	2	2	37	30	7	233	2676	480	75	S	1
129	2	2	52	37	15	102	596	60	29	S	1
130	2	SI	32	22	10	16	12	0	4	S	2
131	1	1	45	31	14	226	2676	480	109	SF	1
132	2	2	63	58	5	137	1471	60	2	S	1
133	1	2	59	45	14	227	616	240	11	SF	2
134	2	1	48	30	18	109	56	480	77	F	2
135	2	1	55	47	8	234	2676	480	37	SF	1
136	2	1	53	24	29	27	10	120	9	F	4
137	2	1	31	27	4	158	114	240	23	ND	2
138	2	2	73	73	0	29	6	60	57	ND	1
139	2	SI	65	50	15	37	25	120	6	ND	1
140	2	2	45	38	7	216	695	60	4	S	2
141	2	2	58	51	7	6	2514	0	14	SF	1
142	2	1	57	49	8	30	100	0	1	S	1
143	2	1	65	63	2	7	10	0	2	ND	1
144	2	1	38	34	4	7	27	60	7	S	1
145	2	1	61	41	20	190	186	480	33	SF	1
146	2	1	66	66	0	100	19	0	1	S	2
147	2	1	59	57	2	44	108	120	12	S	2
148	2	2	54	50	4	107	1498	240	16	SS07	4
149	2	1	33	31	2	46	39	120	40	SF	1
150	2	1	65	50	15	230	392	1920	61	S	1

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
151	2	SI	55	49	6	68	457	480	65	ND	4
152	2	1	42	41	1	56	58	0	9	ND	1
153	2	1	57	46	11	233	1340	120	72	S	2
154	2	1	54	45	9	254	2607	0	4	S	1
155	2	SI	51	38	13	12	28	0	4	S	3
156	2	1	39	27	12	44	180	0	13	S	1
157	2	1	69	46	23	172	2676	256	76	S	1
158	2	1	61	35	26	192	2516	512	97	ND	3
159	2	1	40	24	16	109	34	32	3	S	2
160	2	1	54	54	0	116	59	256	57	F	1
161	2	2	54	23	31	243	2399	256	27	S	2
162	2	1	54	48	6	13	14	0	1	SF	1
163	1	1	42	35	7	8	92	0	0	F	3
164	2	1	57	51	6	229	736	64	40	S	1
165	2	1	55	51	4	7	22	0	2	SF	1
166	2	1	59	46	13	233	343	32	10	SF	1
167	2	1	47	35	12	168	1599	1024	97	S	2
168	2	1	56	44	12	6	15	0	0	S	1
169	2	1	29	29	0	196	2676	128	125	SF	1
170	1	1	40	33	13	236	2921	256	97	S	2
171	1	2	31	31	0	6	56	32	1	SS07	1
172	2	1	43	39	4	146	88	512	48	S	1
173	1	1	59	53	6	195	437	256	30	S	2
174	1	1	54	46	8	72	34	0	3	S	1
175	1	1	40	39	1	9	26	0	3	S	1

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

continua

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
176	2	1	55	46	9	236	2538	128	17	SF	2
177	2	2	56			230	670	256	97	SF	
178	1	1	62	59	3	202	189	128	56	S	1
179	2	1	63	59	4	36	50	128	8	SF	2
180	2	2	46	41	5	169	1815	64	2	S	2
181	2	2	65	45	20	238	2921	32	2	SF	2
182	2	1	46	43	3	142	303	32	5	S	1
183	1	1	44	44	0	168	496	128	18	S	2
184	1	1	27	25	2	70	256	32	14	S	1
185	2	2	50	45	5	216	534	1024	97	SF	1
186	2	2	53	50	3	172	95	32	4	S	2
187	2	2	43	38	5	243	1634	512	97	S	2
188	2	1	43	41	2	14	113	0	2	S	2
189	2	1	46	18	28	9	48	0	1	S	2
190	2	1	50	47	3	9	32	0	0	SF	2
191	2	1	58	54	4	248	154	512	97	S	2
192	2	1	55	50	5	73	44	0	3	S	2
193	1	1	67	63	4	206	2921	128	9	S	1
194	2	1	50	50	0	128	1067	64	52	S	2
195	2	1	28	16	12	98	182	32	9	SF	2
196	2	1	58	42	16	23	70	0	1	S	2
197	2	SI	38	27	11	54	98	0	10	S	1
198	2	1	36	27	9	134	51	256	97	SF	2
199	2	1	61	46	15	238	2548	64	2	F	2
200	2	1	42	37	5	134	26	64	34	SF	1

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA, DURAÇÃO DA DOENÇA, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM E IgA, FENÓTIPO DE BF E CLASSE FUNCIONAL

Nº	Gênero	Etnia	Idade	Idade de Início	Duração da doença	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Classe Funcional
201	2	1	50	48	2	206	590	64	25	SF	3
202	2	2	56	54	2	47	61	256	24	SF	2
203	2	SI	44	29	15	198	738	64	97	SF	2
204	1	1	60	54	6	152	154	0	1	S	1
205	2	1	57	46	11	8	337	256	101	S	1
206	2	2	55	50	5	29	16	64	4	S	2
207	2	1	53	38	15	196	71	128	19	S	2
208	2	1	61	53	8	168	2921	64	28	S	1
209	1	2	77	69	8	13	25	32	1	SF	2
210	2	2	27	24	3	7	2921	0	1	SF	1

NOTAS: Anti-CCP = anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado;  
 Anti-MCV = anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada  
 FR-IgM = fator reumatoide da classe IgM  
 FR-IgA = fator reumatoide da classe IgA  
 BF = Fator BF

APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

continua

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
1	S	N	N	S
2	N	N	N	N
3	N	N	N	SI
4	N	S	N	N
5	N	SI	N	N
6	N	N	Fibrose pulmonar	SI
7	N	N	N	SI
8	N	N	N	N
9	S	S	N	S
10	N	SI	N	S
11	S	S	N	N
12	N	SI	N	N
13	N	N	N	N
14	N	N	N	N
15	N	N	N	N
16	S	SI	SI	S
17	S	S	N	S
18	S	N	N	S
19	N	S	N	N
20	N	N	SI	S
21	N	N	SI	N
22	N	S	N	N
23	N	N	Fibrose pulmonar	N
24	N	S	N	N
25	N	S	N	S
26	N	N	N	N
27	N	N	Fibrose pulmonar	N
28	N	SI	N	N
29	S	S	Fibrose pulmonar	N
30	S	SI	Fibrose pulmonar	S
31	N	N	N	S
32	N	SI	N	S
33	N	N	N	S
34	N	S	Fibrose pulmonar	N
35	N	N	N	S
36	N	N	N	S
37	N	N	N	N
38	N	S	N	N
39	N	N	N	N
40	N	N	N	N
41	N	SI	N	N



APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

continua

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
42	N	SI	N	N
43	N	N	N	S
44	S	N	N	S
45	N	N	N	N
46	N	S	N	N
47	S	S	N	S
48	N	N	N	N
49	N	N	N	S
50	N	S	N	S
51	S	S	N	N
52	N	N	Fibrose pulmonar	S
53	N	N	SI	S
54	N	SI	N	S
55	N	SI	N	S
56	N	S	N	S
57	N	N	N	N
58	N	S	N	N
59	N	S	N	N
60	N	N	N	S
61	N	S	N	S
62	N	S	Fibrose pulmonar	S
63	N	S	N	N
64	N	N	N	N
65	N	N	N	SI
66	N	N	N	S
67	S	N	N	S
68	N	N	N	SI
69	N	N	N	S
70	N	N	N	N
71	N	N	N	S
72	N	N	N	S
73	N	S	N	N
74	N	N	N	N
75	N	N	N	N
76	N	N	SI	N
77	N	N	N	S
78	N	S	N	SI
79	N	S	N	N
80	N	N	N	S
81	N	N	N	S
82	N	S	N	S

APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

continua

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
83	N	N	N	N
84	N	N	N	N
85	N	S	N	N
86	S	N	N	N
87	N	N	SI	N
88	N	N	N	S
89	N	N	N	S
90	N	N	Fibrose pulmonar	N
91	N	S	N	SI
92	N	N	N	S
93	N	N	N	SI
94	N	N	N	S
95	N	S	N	N
96	N	N	N	S
97	N	S	N	N
98	N	S	N	N
99	N	N	N	S
100	N	N	N	S
101	N	N	N	SI
102	N	N	Fibrose pulmonar	S
103	N	N	N	N
104	N	N	SI	SI
105	N	N	SI	N
106	N	N	SI	SI
107	N	N	N	SI
108	N	N	N	S
109	N	N	N	S
110	N	N	N	S
111	N	N	N	S
112	N	S	N	S
113	N	N	Fibrose pulmonar	N
114	N	N	N	S
115	N	S	N	N
116	N	N	N	S
117	N	N	N	N
118	N	N	N	N
119	N	N	N	N
120	N	N	N	N
121	N	S	N	N
122	N	N	N	N
123	N	N	N	S

APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

continua

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
124	N	S	N	S
125	N	N	N	N
126	N	N	N	N
127	N	S	N	S
128	N	N	N	S
129	N	N	N	N
130	N	N	N	N
131	N	S	N	S
132	N	S	N	N
133	N	S	SI	S
134	N	N	N	N
135	N	S	N	N
136	N	S	Fibrose pulmonar	S
137	N	N	N	N
138	N	N	N	S
139	N	N	N	N
140	N	N	N	S
141	N	SI	SI	SI
142	N	N	N	S
143	N	SI	N	N
144	N	N	N	N
145	N	S	N	S
146	N	N	N	N
147	N	N	SI	N
148	S	N	SI	N
149	N	S	N	N
150	N	S	SI	N
151	N	N	N	N
152	N	N	N	N
153	N	N	N	N
154	N	N	N	N
155	N	N	N	S
156	N	N	N	N
157	SI	SI	SI	SI
158	N	SI	N	S
159	N	S	N	N
160	N	N	SI	S
161	S	SI	N	N
162	N	N	N	S
163	N	N	N	S
164	N	SI	N	S

APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATOIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

continua

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
165	SI	N	N	N
166	SI	SI	SI	
167	N	SI	N	N
168	SI	SI	N	S
169	N	S	N	N
170	SI	SI	Fibrose pulmonar	S
171	N	S	SI	S
172	SI	SI	SI	N
173	SI	SI	SI	
174	SI	SI	SI	
175	SI	SI	N	N
176	N	S	N	N
177	SI	SI	SI	
178	N	N	N	S
179	N	N	N	S
180	SI	SI	SI	
181	N	N	N	N
182	SI	SI	N	N
183	SI	SI	SI	N
184	N	N	SI	N
185	N	N	N	S
186	SI	SI	SI	N
187	S	SI	SI	S
188	N	SI	SI	N
189	SI	SI	SI	
190	N	SI	SI	N
191	N	N	N	N
192	N	N	SI	S
193	SI	SI	SI	N
194	N	SI	SI	S
195	N	SI	N	N
196	N	N	N	N
197	SI	SI	SI	
198	N	N	N	S
199	N	SI	Fibrose pulmonar	S
200	N	SI	N	S
201	N	SI	N	S
202	S	SI	SI	N
203	SI	SI	N	S
204	N	SI	N	S
205	SI	SI	N	S

APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: NÚMERO, PRESENÇA DE NÓDULOS REUMATÓIDES, SÍNDROME DE SJÖGREN, PNEUMONITE E TABAGISMO

Nº	Nódulos Reumatóides	Síndrome de Sjögren	Pneumonite	Tabagismo
06	N	SI	N	S
207	N	S	N	S
208	N	SI	N	N
209	SI	S	S	S
210	N	SI	N	N

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
1	2	1	47	1	9	30	0	2	S	0	N
2	2	2	40	1	9	74	0	10	S	0	N
3	1	1	44	1	8	30	0	31	S	0	N
4	1	1	52	1	8	16	0	23	S	0	N
5	2	1	36	1	9	22	0	2	S	0	N
6	2	1	48	1	9	28	0	4	S	0	S
7	2	1	38	1	10	21	0	5	S	0	N
8	2	1	15	1	9	18	0	1	SF	SI	N
9	2	1	29	1	12	39	0	2	S	0	N
10	2	1	26	1	10	23	0	2	S	0	S
11	2	1	29	1	9	20	0	4	SF	0	S
12	2	1	29	1	10	17	0	2	S	0	S
13	1	2	48	1	10	12	30	2	S	0	S
14	2	2	47	1	11	49	0	5	S	0	N
15	2	1	25	1	139	126	60	155	FS07	1	N
16	2	1	46	1	13	25	0	3	SF	1	N
17	2	1	63	1	18	30	0	2	SF	0	N
18	2	1	55	1	14	18	0	3	SF	0	N
19	2	1	39	1	9	13	0	4	S	0	N
20	1	1	33	1	8	12	30	5	S	0	S
21	2	1	31	1	10	21	0	2	S	0	N
22	2	2	52	2	13	22	0	4	SF	0	N
23	2	2	10	1	11	9	0	1	SF	0	N
24	2	2	14	1	10	85	0	2	SF	0	N
25	2	1	49	1	9	22	0	1	S	1	N
26	2	1	53	1	14	18	0	3	S	1	S

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
27	1	1	60	1	9	15	0	40	SF	0	N
28	1	1	57	1	121	14	0	4	SS07	0	N
29	1	2	16	1	8	8	0	16	FS07	0	N
30	1	1	28	1	19	21	0	3	S	0	N
31	2	1	51	1	9	17	0	3	S	0	N
32	1	1	32	1	9	18	0	1	S	0	S
33	2	1	12	2	7	16	0	2	SF	0	N
34	2	2	36	1	9	9	0	1	SF	0	S
35	1	1	24	1	9	25	0	2	SF	0	N
36	2	1	21	1	13	18	0	2	S	0	N
37	2	1	52	1	38	1156	0	5	SF	0	S
38	2	1	23	1	9	28	0	2	SF	0	N
39	2	1	42	1	9	22	0	4	FS07	0	S
40	1	1	38	1	10	17	0	2	F	0	N
41	2	1	45	1	20	148	30	10	SS07	0	N
42	1	2	7	1	10	13	0	1	S	0	N
43	2	1	13	1	14	127	0	2	SF	1	N
44	2	1	16	1	15	60	0	14	SF	0	N
45	2	2	9	1	9	17	0	2	S	0	N
46	2	1	37	1	11	20	30	3	SS07	0	N
47	2	1	26	1	10	21	0	5	F	0	N
48	2	1	35	1	12	39	0	3	SS07	1	N
49	1	2	37	1	19	18	0	12	SF	0	N
50	1	1	14	1	11	80	0	3	SF	0	N
51	2	2	54	1	10	280	0	2	SF	0	N
52	2	1	55	1	9	19	0	7	S	0	S

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
53	2	1	39	1	14	23	0	3	SF	0	N
54	2	1	56	1	10	17	0	1	S	0	N
55	1	1	31	1	10	12	0	3	SS07	0	N
56	1	2	40	1	10	19	0	8	S	0	S
57	1	2	11	1	10	26	0	2	S	0	N
58	2	2	34	1	9	24	0	1	S	0	S
59	1	1	45	1	9	14	0	10	SF	0	N
60	1	1	13	1	10	13	0	2	SF1	0	N
61	2	1	33	1	9	22	30	2	S	0	N
62	1	1	34	1	9	16	0	1	S	0	N
63	1	1	37	1	33	29	0	3	S	0	N
64	1	1	30	1	9	15	0	2	S	0	N
65	1	1	38	1	10	29	0	3	S	0	N
66	2	1	31	1	232	130	30	33	S	1	N
67	1	2	55	1	10	16	0	4	S	0	S
68	1	1	14	1	10	23	0	2	S	0	N
69	2	1	25	1	11	30	0	1	S	0	N
70	2	1	30	1	9	14	0	1	SS07	1	S
71	2	1	51	1	9	12	0	1	SS07	0	S
72	2	1	56	1	10	18	0	2	F	0	N
73	2	1	73	1	10	15	0	7	S	0	S
74	1	1	44	1	9	29	0	0	S	0	S
75	1	1	30	1	11	17	0	1	S	0	S
76	2	1	28	1	9	16	0	1	S	0	S
77	1	1	36	1	9	31	0	2	S	0	N
78	1	1	26	1	13	15	0	4	S	0	N



APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
79	1	1	28	1	10	16	0	5	SS07	0	S
80	2	1	32	1	12	22	0	3	S	0	N
81	1	2	22	1	10	13	0	0	S	0	N
82	1	2	21	1	10	28	0	3	S	0	N
83	2	2	17	1	12	17	0	2	S	0	N
84	2	2	17	1	54	15	0	2	S	0	N
85	2	1	17	1	11	32	0	4	S	1	N
86	1	2	24	1	11	34	0	2	S	0	N
87	1	2	26	1	10	30	0	4	S	0	N
88	2	2	65	1	38	1	0	2	S	0	S
89	2	2	56	1	12	15	0	3	S	0	S
90	2	1	67	1	11	27	0	2	SS07	0	N
91	2	1	54	1	12	17	0	4	SS07	0	N
92	2	2	68	1	10	18	0	3	SF	0	S
93	2	2	40	1	12	12	0	4	SF	0	N
94	1	1	16	1	9	11	0	1	SF	1	N
95	2	1	32	1	10	16	0	4	SF	0	N
96	2	1	42	1	10	12	0	17	S	0	S
97	2	1	33	1	8	18	0	2	S	0	N
98	2	1	13	2	10	23	0	1	S	0	N
99	1	1	48	1	8	10	0	5	SF	0	S
100	2	1	43	1	10	38	0	2	SF	0	S
101	1	1	47	1	8	16	0	7	SF	0	S
102	2	1	41	1	10	11	0	2	S	0	S
103	1	1	13	1	8	7	0	1	S	0	N
104	1	1	48	1	9	19	0	6	S	0	S

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
105	2	1	21	1	8	21	0	2	SF	0	N
106	1	1	31	1	9	9	0	2	SF	0	S
107	1	1	29	1	9	24	0	1	F	0	N
108	2	1	29	1	9	9	0	4	S	0	S
109	1	1	63	2	8	18	0	5	F	0	S
110	2	1	56	1	9	7	0	3	S	1	N
111	1	1	38	1	9	13	0	3	SF	0	S
112	2	2	65	1	9	18	0	2	S	0	N
113	1	2	37	1	8	11	0	3	S	1	N
114	2	2	25	1	12	17	0	5	S	0	N
115	2	1	40	1	8	13	0	2	F	0	N
116	1	1	21	1	9	10	0	4	S	0	N
117	1	1	30	1	10	13	0	1	SF	0	N
118	1	1	56	1	10	22	0	5	F	0	N
119	1	1	35	1	10	9	0	2	S	0	S
120	1	1	37	1	7	18	0	6	S	0	S
121	2	1	49	1	8	7	0	2	SF	0	S
122	1	1	38	1	12	20	0	7	SF	1	S
123	1	1	27	1	9	10	0	1	SF	0	S
124	1	1	41	1	13	14	0	13	SF	0	S
125	2	1	18	2	11	40	30	4	SF	0	N
126	1	1	31	1	10	9	0	24	FS07	0	N
127	2	1	91	1	7	26	0	2	F	0	N
128	2	1	49	1	9	12	30	3	SF	0	N
129	2	1	70	1	10	12	30	11	SF	0	N
130	1	1	31	1	8	8	0	3	S	0	S

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
131	2	1	48	1	8	6	0	3	S	0	N
132	2	1	63	1	9	61	0	128	SF	1	S
133	1	1	37	1	8	11	0	11	SF	0	N
134	2	1	46	1	8	11	0	3	SF	0	N
135	2	1	46	1	215	110	1280	128	F	1	S
136	1	1	43	1	9	26	0	3	SF	0	N
137	2	1	54	1	8	23	0	10	SF	0	N
138	1	1	26	1	7	13	0	6	F	0	S
139	2	1	67	1	7	13	0	1	S	0	N
140	1	1	70	1	13	8	0	4	S	0	S
141	2	1	44	1	10	6	0	3	S	0	N
142	2	1	52	2	14	10	0	6	SF	0	S
143	2	1	54	1	11	12	0	4	FS07	0	N
144	2	2	56	1	16	13	0	1	S	0	N
145	2	1	39	1	9	13	0	5	SF	0	N
146	1	1	15	1	7	8	0	2	SF	0	N
147	2	1	34	1	7	8	30	4	SF	1	N
148	1	1	35	1	7	16	0	3	S	0	S
149	2	1	48	1	12	12	0	2	S	0	S
150	1	1	24	1	8	13	0	2	S	0	S
151	1	1	43	1	13	7	0	4	S	0	S
152	2	1	51	1	8	10	30	4	S	0	N
153	1	2	32	1	9	18	0	4	SF	0	N
154	2	1	40	1	7	10	0	8	S	0	N
155	2	1	26	1	7	15	0	2	F	0	N
156	1	2	55	1	9	13	0	1	SF	0	N

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

continua

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
157	2	1	45	1	12	8	0	2	SF	0	N
158	1	1	72	1	11	17	0	2	S	0	N
159	1	1	49	1	13	87	40	2	S	0	N
160	1	1	47	1	8	6	0	3	SF	0	S
161	2	1	38	1	9	13	0	3	S	0	N
162	1	1	36	1	7	9	0	1	SF	0	N
163	2	2	41	1	7	19	0	3	S	0	N
164	1	2	72	1	9	28	0	4	S	0	S
165	2	2	34	1	8	18	30	10	SF	1	N
166	1	2	33	1	8	25	0	5	SF	0	N
167	2	2	32	1	7	12	0	4	SF	0	N
168	1	1	44	1	11	9	0	2	S	0	N
169	2	2	30	1	8	53	0	3	S	1	N
170	2	2	33	1	8	208	0	4	S	0	N
171	1	1	16	2	8	7	0	4	F	0	N
172	1	2	15	2	14	9	0	2	S	0	N
173	1	2	25	1	10	9	0	2	SF	0	S
174	2	2	17	1	8	33	0	2	SF	0	N
175	2	1	15	1	8	18	0	7	SS07	0	N
176	1	1	30	1	8	22	0	1	S	0	N
177	2	1	32	1	19	30	0	2	S	0	N
178	2	1	42	1	234	29	80	1	S	1	N
179	2	1	43	2	7	21	0	1	SF	0	N
180	2	1	11	1	11	122	0	2	FS07	0	N
181	2	1	39	1	7	28	0	2	SF	0	N
182	1	1	33	1	16	9	0	2	SF	0	N

APÊNDICE 3 – DADOS REFERENTES AOS FAMILIARES DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE: GÊNERO, ETNIA, IDADE, GRAU DE PARENTESCO, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA, FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA, FENÓTIPO DE BF, ARTRALGIA E TABAGISMO

Nº	Gênero	Etnia	ID	GP	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF	Artralgia	Tabagismo
183	2	1	16	2	148	40	0	2	SF	0	N
184	2	1	32	1	10	30	0	1	S	1	N
185	2	1	33	1	12	25	0	1	SF	0	S
186	2	1	39	1	10	14	0	1	SF	0	N
187	2	1	39	1	9	13	0	2	SS07	0	N
188	2	1	31	1	10	954	0	3	S	1	S
189	2	1	27	1	9	22	0	1	S	1	S
190	2	1	23	1	7	11	0	1	S	0	N
191	2	1	18	2	9	17	0	2	S	0	N
192	2	2	38	1	10	20	0	3	S	0	N
193	2	1	15	1	10	15	0	8	SF	0	N
194	2	1	11	1	10	24	0	3	SF	0	N
195	1	1	49	1	9	30	0	5	S	0	N
196	2	1	37	1	8	16	0	3	SF	0	N
197	2	2	20	1	9	38	0	2	S	0	N
198	2	1	26	2	8	20	0	56	S	0	N

NOTAS: ID = Idade; GP = Grau de parentesco

CCP = anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado;

MCV = anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada;

FR = fator reumatoide

BF = fator B

APÊNDICE 4 – DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NÚMERO, GÊNERO, IDADE, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA E FENÓTIPO DE BF

continua

Nº	GÊNERO	ID	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF
1	2	26	11	82	N	1	S
2	2	38	10	16	N	1	SF
3	2	40	8	17	N	1	SF
4	2	23	10	19	N	6	SF
5	2	30	8	19	N	2	SF
6	2	31	8	18	N	1	S
7	2	39	10	18	N	1	S
8	2	33	10	20	N	2	SF
9	1	54	10	22	N	6	S
10	1	47	8	28	N	3	S
11	2	27	10	17	N	4	S
12	2	28	13	25	N	5	S
13	2	27	9	20	N	4	S
14	2	24	8	17	N	1	SF
15	2	26	9	21	N	1	S
16	2	26	9	34	N	2	SF
17	2	33	13	27	N	4	SF1
18	2	51	10	35	N	1	F
19	2	56	10	44	N	3	S
20	2	30	12	14	120	1	S
21	1	25	11	24	N	97	SF
22	2	42	9	44	N	2	S
23	2	34	7	20	N	2	S
24	2	37	9	110	N	1	F
25	2	26	9	19	N	3	SF
26	2	30	19	17	N	2	S
27	2	29	16	22	60	2	S
28	2	36	8	17	N	2	SF1
29	2	28	11	72	N	1	S
30	2	28	8	18	N	2	S
31	2	31	8	21	N	1	SF
32	2	32	9	47	N	1	SF
33	2	26	8	25	N	3	S
34	1	36	10	54	N	3	S
35	1	29	9	14	N	1	S
36	2	41	9	15	N	2	SS07
37	2	45	10	26	N	1	SF
38	2	40	9	14	N	2	SF
39	1	44	8	24	N	1	S
40	2	34	8	49	N	1	S

APÊNDICE 4 – DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NÚMERO, GÊNERO, IDADE, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA E FENÓTIPO DE BF

continua

Nº	GÊNERO	ID	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF
41	2	24	7	22	N	1	SF
42	2	24	10	34	N	5	SF
43	2	56	8	58	60	2	F.S07
44	2	64	8	86	N	2	S
45	2	65	8	26	N	1	S
46	2	71	10	46	N	2	S
47	1	70	11	37	N	4	SF
48	1	37	10	22	N	2	SF
49	2	45	8	23	N	3	S
50	1	51	8	14	N	1	SF
51	2	42	7	16	N	2	S
52	2	41	8	36	N	1	S
53	2	41	8	19	N	1	SF
54	2	63	8	36	N	1	S
55	2	49	8	16	N	2	S
56	2	50	8	440	N	2	SF
57	2	55	10	39	N	5	SF
58	2	50	24	35	N	1	S
59	2	51	7	20	N	1	S
60	2	68	8	32	N	2	FF1
61	2	60	7	27	N	1	SS07
62	2	40	8	31	N	3	S
63	2	49	10	22	N	2	SF
64	2	40	8	13	N	2	SS07
65	2	51	7	27	N	1	S
66	1	70	7	28	N	2	S
67	1	51	8	28	N	2	S
68	2	72	11	44	N	5	SF
69	2	52	7	28	N	2	SF
70	1	61	16	22	N	4	SF
71	2	54	9	50	N	1	S
72	2	53	7	32	N	2	S
73	2	80	7	27	N	5	S
74	2	56	7	36	60	21	SF
75	1	70	8	36	N	2	S
76	2	69	7	33	N	2	S
77	2	58	9	40	N	1	SF
78	2	81	7	29	N	2	S
79	1	69	7	15	N	3	S
80	2	61	7	27	N	11	S

APÊNDICE 4 – DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE: NÚMERO, GÊNERO, IDADE, ANTICORPOS ANTIPEPTÍDEO CÍCLICO CITRULINADO, ANTICORPO ANTIVIMENTINA CITRULINADA MUTADA FATOR REUMATOIDE IgM, FATOR REUMATOIDE IgA E FENÓTIPO DE BF

Nº	GÊNERO	ID	Anti-CCP	Anti-MCV	FR-IgM	FR-IgA	BF
81	1	73	11	67	N	10	F
82	2	78	9	46	N	2	S
83	1	75	7	43	60	4	ND
84	2	60	8	21	N	1	S
85	2	53	10	34	N	2	SS07
86	2	51	8	18	N	1	S
87	2	50	8	18	N	2	S
88	2	50	8	20	N	2	S
89	2	51	8	15	N	3	S
90	2	57	9	12	N	1	SS07
91	2	61	8	19	60	125	S
92	2	59	8	1013	N	2	S
93	1	70	11	37	N	4	SF
94	2	78	10	ND	N	ND	S
95	2	61	8	ND	N	ND	F
96	2	52	8	ND	N	2	S
97	1	70	7	28	N	ND	S
98	1	72	10	ND	N	ND	SF

NOTAS: IN = iniciais; ID = Idade

Anti-CCP = anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado;  
 Anti-MCV = anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada;  
 FR-IgM = fator reumatoide da classe IgM;  
 FR-IgA = fator reumatoide da classe IgA  
 BF = fator B



APÊNDICE 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES

APÊNDICE 5A - DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS GRUPOS EM ESTUDO EM RELAÇÃO AO GÊNERO DOS INDIVÍDUOS (F vs M)

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES N=180 (%)			FAMILIARES N=198 (%)			CONTROLES N=98 (%)			p*
	F	x	M	F	x	M	F	x	M	
S	141 (92,2)	24 (88,9)		111 (91,7)	69 (89,6)		75 (92,6)	16 (94,1)		ns
F	53 (34,6)	10 (37)		53 (43,8)	32 (41,6)		28 (34,6)	7 (41,2)		ns
F1	2 (1,3)	0 (0)		0 (0)	1 (1,3)		3 (3,7)	0 (0)		ns
S07	7 (4,6)	2 (7,4)		13 (10,7)	5 (6,5)		6 (7,4)	0 (0)		ns
<b>TOTAL</b>	<b>153</b>	<b>27</b>		<b>121</b>	<b>77</b>		<b>81</b>	<b>17</b>		

LEGENDA: F=gênero feminino; M=gênero masculino

p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5B - DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR, EM RELAÇÃO À IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES			p
	18-30 anos	>30 a 60 anos	>60 anos	
S	40 (90,9)	115 (92)	9 (90)	ns
F	18 (40,9)	40 (32)	3 (30)	ns
F1	0	2 (1,6)	0	ns
S07	0	9 (7,2)	0	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 44 pacientes</b>	<b>Em 125 pacientes</b>	<b>Em 10 pacientes</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5C - DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CLASSE FUNCIONAL DA DOENÇA

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES			p
	Classe I	Classe II	Classe III e IV	
S	78 (94)	66 (89,2)	20 (90,9)	ns
F	29 (35)	28 (37,8)	5 (22,7)	ns
F1	1 (1,2)	1 (1,4)	0	ns
S07	3 (3,6)	4 (5,4)	2 (9,1)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 83 pacientes</b>	<b>Em 74 pacientes</b>	<b>Em 22 pacientes</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES

APÊNDICE 5D - DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR, EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES MANIFESTAÇÕES EXTRA-ARTICULARES

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES						p*
	Com Nódulo	Sem Nódulo	Com Fibrose	Sem Fibrose	Com Sjogren	Sem Sjogren	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	14 (93,3)	131 (90,3)	11 (84,6)	122 (91,7)	37 (86)	87 (93,5)	ns
F	7 (46,7)	51 (35,2)	5 (38,5)	48 (36,1)	18 (41,9)	30 (32,3)	ns
FF1	0	2 (1,4)	1 (7,7)	1 (0,75)	1 (2,3)	1 (1,1)	ns
S07	2 (13,3)	7 (4,8)	0	7 (5,3)	5 (11,6)	4 (4,3)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>145</b>	<b>13</b>	<b>133</b>	<b>43</b>	<b>93</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 E – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS FAMILIARES DE PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO A ARTRALGIA

ALÓTIPOS DE BF	Familiares com Artralgia N (%)	Familiares sem Artralgia N (%)	p
S	20 (90,9)	159 (90,9)	ns
F	9 (40,9)	75 (42,9)	ns
F1	0	1 (0,6)	ns
S07	3 (13,6)	15 (8,6)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 22 familiares</b>	<b>Em 175 familiares</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES

APÊNDICE 5 F – ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM AR E FAMILIARES EM RELAÇÃO À POSITIVIDADE DOS BIOMARCADORES

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES (N=180)				p
	Anti-CCP positivo	Anti-MCV positivo	FR-IgM positivo	FR-IgA positivo	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	125 (91,9)	118 (95,2)	110 (90,2)	104 (91,2)	ns
F	49 (36)	40 (32,3)	42 (34,4)	41 (36)	ns
F1	0 (0)	0 (0)	2 (1,6)	2 (1,8)	ns
S07	7 (5,2)	6 (4,8)	7 (5,7)	6 (5,3)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>136</b>	<b>124</b>	<b>122</b>	<b>114</b>	
ALÓTIPOS DE BF	FAMILIARES (N=198)				p
	Anti-CCP positivo	Anti-MCV positivo	FR-IgM positivo	FR-IgA positivo	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	9 (81,8)	13 (81,2)	14 (87,5)	25 (86,2)	ns
F	4 (36,4)	10 (62,5)	7 (43,8)	17 (58,6)	ns
F1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ns
S07	3 (27,3)	3 (18,8)	3 (18,8)	5 (17,2)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>29</b>	

LEGENDA: Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado; Anti-MCV: anticorpo anti-vimentina citrulinada mutada; FR-IgM: fator reumatoide classe IgM; FR-IgA: fator reumatoide classe IgA  
p= não significativo ao nível de 0,05 para todas as análises

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 G – ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM AR EM RELAÇÃO À CONCOMITÂNCIA DOS BIOMARCADORES

ALÓTIPOS DE BF	PACIENTES (N=180)					p
	NÚMERO DE BIOMARCADORES					
	4	3	2	1	NEG	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
S	75 (94,9)	32 (84,2)	24 (92,3)	12 (92,3)	22 (91,7)	ns
F	25 (31,6)	15 (39,5)	9 (34,6)	4 (30,8)	8 (33,3)	ns
F1	0	0	2 (7,7)	0	0	
S07	5 (6,3)	1 (2,6)	1 (3,8)	1 (7,7)	1 (4,2)	ns
TOTAL	79	38	26	13	24	

LEGENDA: p= não significativo ao nível de 0,05 para todas as análises

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E FAMILIARES

APÊNDICE 5 H - DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF NOS PACIENTES COM AR, DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA

ALÓTIPOS DE BF	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgM negativo N (%)	p	FR-IgA positivo N (%)	FR-IgA negativo N (%)	p
S	110 (90,2)	55 (94,8)	ns	104 (91,2)	61 (92,4)	ns
F	42 (34,4)	21 (36,2)	ns	41 (36)	22 (33,3)	ns
F1	2 (1,6)	0 (0)	ns	2 (1,8)	0 (0)	ns
S07	7 (5,7)	2 (3,4)	ns	6 (5,3)	3 (4,5)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 122 pacientes</b>	<b>Em 58 pacientes</b>		<b>Em 114 pacientes</b>	<b>Em 66 pacientes</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 I – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM AR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTI-CCP E ANTI-MCV

ALÓTIPOS DE BF	Anti-CCP positivo N (%)	Anti-CCP negativo N (%)	p	Anti-MCV positivo N (%)	Anti-MCV negativo N (%)	p
S	9 (81,8)	171 (91,4)	ns	13 (81,2)	167 (91,8)	ns
F	4 (36,4)	81 (43,3)	ns	10 (62,5)	75 (41,2)	ns
F1	0 (0)	1 (0,5)	ns	0 (0)	1 (0,6)	ns
S07	3 (27,3)	15 (8)	0,0657	3 (18,8)	15 (8,2)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 11 familiares</b>	<b>Em 187 familiares</b>		<b>Em 16 familiares</b>	<b>Em 182 familiares</b>	

LEGENDA: <sup>(1)</sup>Alótipos BF S07 familiares anti-CCP+ vs alelo BF S07 familiares anti-CCP-; p=0,0657  
p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

APÊNDICE 5 J – DISTRIBUIÇÃO DOS PORTADORES DE ALÓTIPOS DE BF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM AR DE ACORDO COM A PRESENÇA DE FR-IgM E FR-IgA

ALÓTIPOS DE BF	FR-IgM positivo N (%)	FR-IgM negativo N (%)	p	FR-IgA positivo N (%)	FR-IgA negativo N (%)	p
S	14 (87,5)	166 (91,2)	ns	25 (86,2)	155 (91,7)	ns
F	7 (43,8)	78 (42,9)	ns	17 (58,6)	68 (40,2)	ns
F1	0 (0)	1 (0,6)	ns	0 (0)	1 (0,6)	ns
S07	3 (18,8)	15 (8,2)	ns	5 (17,2)	13 (7,7)	ns
<b>TOTAL</b>	<b>Em 16 familiares</b>	<b>Em 182 familiares</b>		<b>Em 29 familiares</b>	<b>Em 169 familiares</b>	

LEGENDA: p\*= não significativo para todas as análises ao nível de 0,05

NOTA: Teste exato de Fisher

## **ANEXOS**

ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA .....	184
ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS FAMILIARES.....	185

## ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade  
Evangélica Beneficente de Curitiba*

*Rua Padre Anchieta, 2770  
80730-000 Curitiba – PR  
Fone: 41 3240-5570  
Fax: 41 3240-5584*

Curitiba, 30 de março de 2011.

Thelma Larocca Skare  
Shirley Utiyama

Prezadas Colegas,

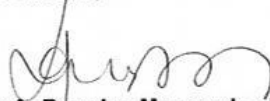
Comunicamos a V. Sa. que, em reunião ordinária do dia 29 de março de 2011, foi aprovado o projeto de pesquisa intitulado **“Variabilidade alotípica do fator B do sistema complemento em pacientes de artrite reumatóide e familiares. Associação com fatores imunológicos e aspectos clínicos da doença”**. Protocolado neste Comitê sob número **870/11** em 10 de fevereiro de 2011.

Prevê a legislação que toda a documentação do projeto poderá, a qualquer momento, ser solicitada para inspeção por parte dos órgãos federais; desta forma, manterá o Comitê arquivo detalhado de cada projeto, arquivando em pasta individual o projeto inicial e relatórios de acompanhamento.

Para o projeto de V. Sa., solicitamos que dê ciência aos seus colaboradores da obrigação de, a cada seis meses a partir da data de hoje, encaminhar a este comitê relatório detalhado do andamento do projeto.

Relatórios previstos para: **20/09/2011**

Atenciosamente,



**Carmen A. Paredes Marcondes Ribas**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

## ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS FAMILIARES

Nome.....

Nome do paciente com AR.....

Grau de parentesco: ( ) 1º ( ) 2º

## Dados demográficos:

Idade..... Sexo ( ) F ( ) M Estado

civil.....

Etnia : ( ) branca ( ) índio ( ) amarela ( ) afro fone.....

Tabagista ( ) sim ( ) não ( ) ex Etilista ( ) sim ( ) não ( ) ex

## Anamnese dirigida:

Dor nas juntas ( ) S ( ) N Se sim, em quantas.....

Se sim: Incha também ? ( ) S ( ) N

Algum problema com a pele ? ( ) S ( ) N Se sim, qual ?.....

Dor de barriga/ flatulência ( ) S ( ) N

Diarréia ( ) S ( ) N

Intestino preso ( ) S ( ) N

Perda de peso ( ) S ( ) N

Ganho de peso ( ) S ( ) N

Amarelão na pele (icterícia) ( ) S ( ) N

Problemas de fígado ( ) S ( ) N

Doença de tireóide ( ) S ( ) N

Sonolência exagerada ( ) S ( ) N

Queda de cabelo ( ) S ( ) N

Anemia ( ) S ( ) N

Abortos ( ) S ( ) N quantos..... semestre:.....

Osteoporose ou fratura anterior ( ) S ( ) N

Doenças anteriores:

Medicamentos em uso: